

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Roberta da Silva Rosso

**OTIMIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL
DE TOMILHO: ESTABILIDADE, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E
LIBERAÇÃO *IN VITRO***

Santa Maria, RS
2019

Roberta da Silva Rosso

**OTIMIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
TOMILHO: ESTABILIDADE, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E LIBERAÇÃO *IN*
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Cristiane de Bona da Silva

Santa Maria, RS
2019

Rosso, Roberta da Silva

Otimização de nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho: estabilidade, atividade antifúngica e liberação in vitro / Roberta da Silva Rosso.- 2019.

133 p.; 30 cm

Orientador: Cristiane de Bona da Silva

Coorientador: Roger Wagner

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

1. Thymus vulgaris 2. Timol 3. Candida albicans 4. Nanotecnologia 5. Headspace I. Silva, Cristiane de Bona da II. Wagner, Roger III. Título.

Roberta da Silva Rosso

**OTIMIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
TOMILHO: ESTABILIDADE, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E LIBERAÇÃO *IN*
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 02 de julho de 2019:

Cristiane de Bona da Silva, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Roger Wagner, Dr. (UFSM)
(Coorientador)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)

Aline Ferreira Ourique, Dra. (UFN) - Parecer

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Marino e Inês Terezinha, meus eternos anjos da guarda e a minha família, minha base, essenciais para o início, meio e fim desta jornada.

AGRADECIMENTOS

A felicidade do dever cumprido é imensa, mas chegar no final desta jornada e perceber todas as pessoas que foram peças-chaves para que este sonho se tornasse realidade, torna a vida ainda mais cheia de sentido, por mais que a chegada seja o lugar mais esperado, o caminhar destes dois anos ao lado de vocês foi o que tornou essa fase mais especial. Deixo aqui minha gratidão a todos que foram essenciais para concretização deste trabalho.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, a qual sem Ele nem o início e nem o final deste sonho teria sido possível.

Aos meus pais Sérgio e Valéria, por sempre terem acreditado e incentivado meus sonhos, por serem meu porto seguro, meu apoio, minha força e por viverem comigo cada escolha. Obrigada pelo amor mais puro e incondicional!

À minha irmã/“filha” Larissa por ter compartilhado não só esses dois últimos anos, mas os últimos 8 anos de convivência diária em Santa Maria. Obrigada pelas palavras de incentivo depois de um dia cansativo, pelo amor compartilhado no dia-a-dia e pelas inúmeras conversas com um bom chimarrão. Ao meu irmão Sérgio, por ter me ajudado a aliviar o cansaço e a pressão dos dias, resgatando a leveza, o amor, a simplicidade e a diversão em um simples encontro no final de semana.

Ao meu noivo/esposo Matheus, por todo apoio, pelas muitas palavras de incentivo redigidas quando a presença não era possível, pelo amor e compreensão nos momentos de ausência e estresse. Obrigada por muitas vezes estar presente mesmo distante.

À minha orientadora Cris, por ter me acolhido desde a iniciação científica, acreditado no meu potencial e buscado sempre o melhor de mim. Obrigada por todos os ensinamentos, por ter ajudado a me tornar uma pessoa mais confiante e positiva, por mais difícil que fosse. Obrigada por esses 5 anos de aprendizado.

Obrigada as quatro pupilas que tive o privilégio de trabalhar e que me ajudaram em diferentes momentos no decorrer deste trabalho, a Liliana Fantinel, Vanessa Dalenogar e em especial ao Gabi Remuzzi e a Vanessa Birkhahn pelas incansáveis horas de experimentos realizados, pela amizade construída e por todo carinho e cuidado. Vocês foram essenciais para a finalização deste projeto.

Ao Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico, que foi quase minha casa durante esses dois anos, por todas as pessoas que compartilharam comigo essa experiência, por aprender o verdadeiro valor do trabalho em equipe, pelos laços de amizades criados, pelas conversas, risadas, almoços, cafés e chimarrões. Gratidão pelas pessoas especiais que passaram e tornaram esse tempo mais feliz, deixando suas marcas no meu coração.

A Rose, nossa mãezona, por ter sempre me acolhido e transmitido todo carinho do mundo. Pela amizade sincera e verdadeira que construímos. Tua presença foi de extrema importância durante todo esse período. Em especial, gostaria de agradecer a Fê, minha mãe científica, que me ensinou grande parte das coisas que sei sobre nossa área de pesquisa, me acolheu no laboratório e me presenteou com sua amizade.

À Camila, a amiga que o mestrado me deu, pelas inúmeras conversas, de trabalho e de vida, por toda ajuda, fosse me sugerindo, orientando e resolvendo problemas ou fosse com a mão na massa, literalmente, na hora dos experimentos. Obrigada também a Jé, que esteve comigo desde a iniciação científica, pela amizade, por tantas conversas, experiências e conhecimentos trocados. A Vivi, que por diversas vezes me ajudou, sempre com um sorriso no rosto e uma palavra de incentivo. Obrigada também a Aline pelas conversas e sugestões, e aos colegas, que fizeram parte desses dois anos, Lara, Kadu, Tati, Thami, Sílvia, Nadine, Julia e nossa querida amiga Dida, pela convivência.

Ao professor Roger por ter aceitado me coorientar, pelos desafios que me foram propostos e por toda ajuda que me foi oferecida, sempre com muita paciência, dedicação e incentivo. À todos os alunos do seu laboratório, por terem me acolhido tão bem, sempre receptivos e dispostos a ajudar. Em especial, a Bruna Klein, pelas incansáveis extrações e análises cromatográficas, por toda atenção e carinho a mim transmitidos.

Às minhas amigas do coração, Bruna, Cibele, Evelyne e Jamile, pela amizade verdadeira construída na graduação e que se mantém cada vez mais forte apesar da distância. Obrigada por todas as conversas regadas com um bom mate, pelos incentivos, pelo ombro amigo, pelo carinho, cuidado, jantas e almoços, ah, sem esquecer da ajuda técnica em estatística também! Enfim, obrigada por estarem ao meu lado nesse e em todos os momentos.

À Carminha pelas inúmeras autoclavagens durante os experimentos do microbiológico, obrigada! Obrigada também a Rose Kulmann, que sempre esteve disponível para tirar minhas dúvidas do microbiológico com muita paciência.

À professora Thais Dorow, pela identificação do gênero e espécie da planta a qual foi extraída o óleo utilizado neste trabalho, pela atenção e disponibilidade.

Aos laboratórios vizinhos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Laboratório de Farmacognosia e Laboratório de Controle de Qualidade, pelos conhecimentos trocados e auxílio sempre que necessário.

À Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino gratuito e de qualidade. Obrigada por todo conhecimento adquirido nesses 8 anos de casa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela infraestrutura ofertada, pelo auxílio sempre que necessário e todo o conhecimento transmitido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Por isso que o caminho tem que ser aproveitado, deixando pela estrada algo bom para ser lembrado. Vivendo uma vida plena fazendo valer a pena cada passo que foi dado. Aí sim lá na chegada, onde o fim é evidente, é que a gente percebe que foi tudo de repente e aprende na despedida, que o sentido dessa vida é sempre seguir em frente.”

(Bráulio Bessa)

RESUMO

OTIMIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO: ESTABILIDADE, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E LIBERAÇÃO *IN VITRO*

AUTORA: Roberta da Silva Rosso
ORIENTADORA: Cristiane de Bona da Silva
COORIENTADOR: Roger Wagner

Este trabalho teve como principal objetivo a otimização de nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho – *Thymus vulgaris* (20 mg/mL) obtidas a partir do método de homogeneização sob alta velocidade, sem o emprego de solventes orgânicos e elevadas temperaturas, visando explorar a atividade antifúngica do óleo, decorrente da presença de timol e carvacrol em sua composição. O óleo essencial de tomilho foi identificado quanto ao gênero e espécie, caracterizado e quantificado por cromatografia gasosa. Duas nanoemulsões foram desenvolvidas a partir de um delineamento experimental utilizando a metodologia de superfície de resposta, diferindo entre si pelas concentrações de tensoativos. As nanoemulsões foram avaliadas quanto a suas propriedades físico-químicas, como tamanho médio de gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e teor de timol, o qual foi determinado a partir da co-validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência. As formulações apresentaram gotículas de tamanho nanométrico (<150 nm), baixo índice de polidispersão (0,21 – 0,26), potencial zeta negativo (em torno de -8,0 mV), pH levemente ácido (cerca de 5,0) e teor de timol próximo ao teórico. Os mesmos parâmetros foram analisados para o estudo de estabilidade (temperatura ambiente e 5 °C) até 100 dias de armazenamento. Os parâmetros mantiveram-se para a nanoemulsão com maior concentração de tensoativo, em ambas temperaturas de armazenamento. A fim de investigar a proteção exercida pelos sistemas nanoestruturados frente à volatilização dos componentes do óleo essencial, um segundo estudo de estabilidade foi realizado a partir da extração e concentração de amostras das nanoemulsões pela técnica de microextração em fase sólida (HS-SPME) e posterior quantificação por cromatografia gasosa. Para este ensaio, as nanoemulsões foram armazenadas às temperaturas de 5, 20 e 40 °C, ao abrigo da luz, pelo período de 30 dias. Devido ao volume de dados obtidos e para melhor compreensão dos resultados, foi aplicada a Análise de Componentes Principais (ACP). Foi verificado um comportamento distinto para as formulações contendo diferentes concentrações de agentes emulsionantes. A formulação com maior quantidade de tensoativo apresentou características físico-químicas mais adequadas ao sistema nanoestruturado. Deste modo, foi verificado diferença significativa ($p < 0,05$) para as formulações mantidas a 40 °C, pois apresentaram maior concentração de compostos voláteis no *headspace* no final do estudo, incluindo timol e carvacrol, o que demonstrou maior desestabilização do sistema. Concomitante a este estudo, foi realizada a avaliação da atividade antifúngica *in vitro* pelo método de difusão em ágar frente a levedura *Candida albicans*, com as mesmas formulações armazenadas a 5, 20 e 40 °C, no início e no final do período de armazenamento. Este ensaio objetivou verificar se quebras da nanoemulsão e consequente diminuição do óleo na nanoestrutura influenciava a atividade antimicrobiana das formulações. Após 30 dias, foi observado uma redução do halo de inibição para todas as formulações quando comparados ao tempo inicial de armazenamento, porém, a menor atividade antifúngica foi verificada para as nanoemulsões armazenadas a 40 °C, o que é explicado pela maior desestabilização da nanoemulsão quando armazenada nesta temperatura. O estudo de liberação *in vitro* do timol a partir das nanoemulsões evidenciou a capacidade dos sistemas nanoestruturados em controlar a liberação do timol quando comparado ao óleo livre (não associado).

Palavras-chave: *Thymus vulgaris*. Timol. *Candida albicans*. Nanotecnologia. *Headspace*.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF NANOEMULSIONS CONTAINING ESSENTIAL OIL OF THYME: STABILITY, ANTIFUNGAL ACTIVITY AND *IN VITRO* RELEASE

AUTHOR: Roberta da Silva Rosso
ADVISOR: Cristiane de Bona da Silva
CO-ADVISOR: Roger Wagner

The main objective of this work was the optimization of nanoemulsions containing *Thymus vulgaris* essential oil (20 mg/mL) obtained from the high speed homogenization method, without the use of organic solvents and high temperatures, aiming to explore the antifungal activity due to the presence of thymol and carvacrol in its composition. Thyme essential oil was identified according to genus and species, characterized and quantified by gas chromatography. Two nanoemulsions were developed from an experimental design using the response surface methodology, differing among themselves by surfactant concentrations. Nanoemulsions were evaluated for their physicochemical properties, such as average droplet size, polydispersion index, zeta potential, pH and thymol content, which was determined by co-validation of analytical methodology by high performance liquid chromatography. The formulations had nanometer size droplets (<150 nm), low polydispersity index (0.21 - 0.26), negative zeta potential (around -8.0 mV), slightly acidic pH (about 5.0) and thymol content close to the theoretical. The same parameters were analyzed for the stability study (room temperature and 5 °C) up to 100 days of storage. The parameters were maintained for the highest surfactant nanoemulsion at both storage temperatures. In order to investigate the protection exerted by nanostructured systems against volatilization of essential oil components, a second stability study was performed from the extraction and concentration of nanoemulsion samples by the solid phase microextraction technique (HS-SPME) and later quantification by gas chromatography. For this assay, nanoemulsions were stored at 5, 20 and 40 °C, protected from light for 30 days. Due to the volume of data obtained and for a better understanding of the results, Principal Component Analysis (PCA) was applied. A distinct behavior was found for formulations containing different concentrations of emulsifying agents. The formulation with the highest amount of surfactant presented physicochemical characteristics more adequate to the nanostructured system. Thus, a significant difference ($p < 0.05$) was observed for the formulations maintained at 40 °C, as they presented higher concentration of volatile compounds in the *headspace* at the end of the study, including thymol and carvacrol, which demonstrated greater system destabilization. Concomitant to this study, *in vitro* antifungal activity was evaluated by the agar diffusion method against *Candida albicans* yeast, with the same formulations stored at 5, 20 and 40 °C, at the beginning and end of the storage period. This study aimed to verify if nanoemulsion breakdown and consequent decrease of oil in the nanostructure influenced the antimicrobial activity of the formulations. After 30 days, a reduction in the inhibition zone was observed for all formulations when compared to the initial storage time. However, the lowest antifungal activity was observed for nanoemulsions stored at 40 °C, which is explained by the greater destabilization of nanoemulsion. when stored at this temperature. The *in vitro* release study of thymol from nanoemulsions showed the ability of nanostructured systems to control thymol release when compared to free (unassociated) oil.

Keywords: *Thymus vulgaris*. Thymol. *Candida albicans*. Nanotechnology. *Headspace*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Principais vias do metabolismo secundário das plantas.....	40
Figura 2 –	Representação da (a) estrutura química do isopreno (C ₅ H ₈) e (b) ligação 1 – 4 (“cabeça-cauda”) de isoprenos.....	41
Figura 3 –	Ilustração das rotas metabólicas precursoras dos metabólitos secundários das plantas.....	42
Figura 4 –	Síntese de terpenos pela rota bioquímica do ácido mavalônico e do piruvato e 3-fosfoglicerato.....	43
Figura 5 –	Estrutura química do fenilpropanóide eugenol.....	44
Figura 6 –	Metabolismo dos compostos fenólicos em plantas.....	45
Figura 7 –	Estrutura química dos compostos timol (a) e carvacrol (b).....	50
Figura 8 –	Representação esquemática dos sistemas nanoestruturados (a) lipossoma (b) nanocápsula (c) nanoesfera (d) nanoemulsão (e) nanopartícula lipídica sólida (f) carreador lipídico nanoestruturado.....	53
Figura 9 –	Fenômenos de instabilidade das nanoemulsões.....	55
Figura 10 –	Amostra da planta <i>Thymus vulgaris</i> L. coletada na empresa Vimontti.....	67
Figura 11 –	Gráfico de superfície de resposta mostrando os efeitos da relação de Tween [®] 80 e Span [®] 80 no tamanho das gotículas (a) e no índice de polidispersão (b) de nanoemulsões O/A.....	80
Figura 12 –	Diagrama de Pareto com os efeitos estimados do (a) diâmetro médio das gotículas e (b) índice de polidispersão.....	81
Figura 13 –	Aspecto macroscópico das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b).....	82
Figura 14 –	Distribuição do tamanho de gotículas das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b) pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons.....	84
Figura 15 –	Distribuição do potencial zeta das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b) determinado por mobilidade eletroforética.....	85
Figura 16 –	Diâmetro médio das gotículas das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b), armazenadas nas temperaturas de 5 e 25 °C, por um período de 100 dias. Os dados foram expressos em mediana ± intervalo interquartil e analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn’s ($p < 0,05$; $n = 3$).....	87
Figura 17 –	Índice de polidispersão das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b), armazenadas nas temperaturas de 5 e 25 °C, por um período de 100 dias. Os dados foram expressos em mediana ± intervalo interquartil e analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn’s ($p < 0,05$; $n = 3$).....	87
Figura 18 –	Potencial zeta das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b), armazenadas nas temperaturas de 5 e 25 °C, por um período de 100 dias. Os dados foram expressos em mediana ± intervalo interquartil e analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn’s ($p < 0,05$; $n = 3$).....	88

Figura 19 –	Gráficos das áreas cromatográficas de timol (a) e carvacrol (b) no decorrer dos 30 dias de armazenamento do <i>headspace</i> das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas nas temperaturas de 5, 20 e 40 °C. Os dados foram expressos em mediana ± intervalo interquartil e analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$).....	97
Figura 20 –	Gráficos referentes ao diâmetro médio de gotículas (a), índice de polidispersão (b) e potencial zeta (c) das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas nas temperaturas de 5, 20 e 40 °C, por 30 dias. Os dados foram expressos em mediana ± intervalo interquartil e analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($*p < 0,05$; $n = 3$).....	99
Figura 21 –	Análise de componentes principais das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC armazenadas a 20 °C durante 30 dias, na qual o gráfico (a) representa as amostras e o (b) as variáveis.....	102
Figura 22 –	Análise de componentes principais da nanoemulsão NE-OT-CI armazenada à 5, 20 e 40 °C, durante 30 dias, na qual o gráfico (a) representa as amostras e o (b) as variáveis.....	104
Figura 23 –	(a) Resultados obtidos no estudo de liberação <i>in vitro</i> de timol a partir das nanoemulsões (NE-OT-CI e NE-OT-PC) e da solução metanólica (óleo livre) por um período de 30 h. (b) Razão do percentual liberado nos tempos de 0,25 h [%R30h / %R0,25h] e 24 h [%R30h / %R24h]. Os dados foram representados como média ± desvio padrão e analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,01$; $n = 3$).....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Variáveis independentes e seus níveis correspondentes codificados e os valores reais.....	69
Tabela 2 –	Composição do óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>).....	77
Tabela 3 –	Valores obtidos para as variáveis dependentes (tamanho de gotículas e índice de polidispersão).....	79
Tabela 4 –	Caracterização físico-química das nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho a 2% (NE-OT-CI e NE-OT-PC).....	83
Tabela 5 –	Potencial hidrogeniônico das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas nas temperaturas de 5 e 25 °C, por um período de 100 dias. Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$).....	89
Tabela 6 –	Teor das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas nas temperaturas de 5 e 25 °C, por um período de 100 dias. Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$).....	89
Tabela 7 –	Área dos compostos voláteis do óleo de tomilho não associado, determinados por GC/FID pela técnica de HS-SPME e expresso em unidades arbitrárias ($\times 10^4$).....	91
Tabela 8 –	Área dos compostos voláteis da nanoemulsão NE-OT-CI, armazenada à temperatura de 5 °C, determinados por GC/FID pela técnica de HS-SPME e expresso em unidades arbitrárias ($\times 10^4$). Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$).....	92
Tabela 9 –	Área dos compostos voláteis da nanoemulsão NE-OT-CI, armazenada à temperatura de 20 °C, determinados por GC/FID pela técnica de HS-SPME e expresso em unidades arbitrárias ($\times 10^4$). Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$).....	93
Tabela 10 –	Área dos compostos voláteis da nanoemulsão NE-OT-CI, armazenada à temperatura de 40 °C, determinados por GC/FID pela técnica de HS-SPME e expresso em unidades arbitrárias ($\times 10^4$). Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$).....	94
Tabela 11 –	Área dos compostos voláteis da nanoemulsão NE-OT-PC, armazenada à temperatura de 20 °C, determinados por GC/FID pela técnica de HS-SPME e expresso em unidades arbitrárias ($\times 10^4$). Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$).....	95
Tabela 12 –	Potencial hidrogeniônico das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas nas temperaturas de 5, 20 e 40 °C, por 30 dias. Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's (média \pm desvio padrão, $n = 3$).....	100
Tabela 13 –	Diâmetro dos halos de inibição (mm) determinados na avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> do timol (padrão) e das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas em diferentes temperaturas (5, 20 e 40 °C).....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
°C	Grau Celsius
3-PGA	3-fosfoglicerato
ACP	Análise de componentes principais
CDP-ME	4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol
CDP-ME2P	4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetro(s)
CMK	4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol quinase
CP	Componentes principais
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DXP	1-desoxixilulose-5-fosfato
FAL	Fenilalanina amônia-liase
FID	Detector por Ionização de Chama
g	Gramas(s)
GC	Cromatografia Gasosa
h	Hora(s)
HMBPP	1-hidroxi-2C-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato
HMG-CoA	Éster 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HS-SPME	Headspace-microextração em fase sólida
IPP	Isopentil-pirofosfato
KPa	Quilopascal
ME-cPP	2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato
MEP	Metileritritol fosfato
m	Metro(s)
mg	Miligrama(s)
mL	Mililitro(s)
mm	Milímetros(s)
mM	Milimolar
MPa	Megapascal
MS	Espectrometria de Massas
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
MVA	Ácido mevalônico ou mevalonato
MVAP	Mevalonato-5-fosfato
MVAPP	Mevalonato-5-difosfato
PDI	Índice de polidispersão
PEP	Fosfoenolpiruvato
PIC	Inversão de fases por composição
PIT	Inversão de fases por temperatura
psi	Libras por polegada quadrada absoluta
PZ	Potencial zeta
rpm	Rotações por minuto
TCM	Triglicerídeo de cadeia média

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo Geral.....	35
2.2	Objetivos Específicos.....	35
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	39
3.1	PLANTAS E METABOLISMO VEGETAL.....	39
3.1.1	Terpenos	40
3.1.2	Fenilpropanóides	44
3.2	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	45
3.2.1	Obtenção de óleos essenciais	47
3.2.2	Óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> L.	49
3.3	SISTEMAS NANOESTRUTURADOS.....	52
3.3.1	Nanoemulsões	54
3.3.1.1	<i>Métodos de obtenção das nanoemulsões</i>	55
3.3.1.1.1	Métodos de baixa energia de emulsificação.....	55
3.3.1.1.2	Métodos de alta energia de emulsificação.....	56
3.3.2	Delineamento experimental para otimização de formulações	62
4	MATERIAL E MÉTODOS	67
4.1	MATERIAS.....	67
4.2	MÉTODOS.....	67
4.2.1	Identificação e avaliação da composição química do óleo essencial por GC-FID e GC/MS	67
4.2.2	Preparação das nanoemulsões contendo o óleo essencial de tomilho	68
4.2.3	Caracterização físico-química das nanoemulsões	70
4.2.3.1	<i>Determinação do tamanho médio das gotículas e do índice de polidispersão (PDI)</i>	70
4.2.3.2	<i>Determinação do potencial zeta</i>	70
4.2.3.3	<i>Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)</i>	70
4.2.3.4	<i>Determinação do teor de timol das nanoemulsões</i>	70
4.2.4	Estudo de Estabilidade	71
4.2.4.1	<i>Estudo de estabilidade das nanoemulsões</i>	71
4.2.4.2	<i>Estudo de estabilidade das nanoemulsões por cromatografia gasosa utilizando a técnica de microextração em fase sólida (HS-SPME)</i>	71
4.2.4.2.1	Preparação das amostras e processo de extração.....	71
4.2.4.2.2	Condições cromatográficas.....	72
4.2.5	Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	72
4.2.6	Estudo de liberação <i>in vitro</i> de timol das nanoemulsões	73
4.2.7	Análise Estatística	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO POR GC-FID E GC/MS	77
5.2	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	78
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOEMULSÕES.....	82
5.4	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	85
5.4.1	Estudo de estabilidade das nanoemulsões	85

5.4.2	Estudo de estabilidade das nanoemulsões por cromatografia gasosa utilizando a técnica de microextração em fase sólida (HS-SPME).....	89
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>.....	105
5.6	ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO TIMOL A PARTIR DAS NANOEMULSÕES.....	107
6	CONCLUSÃO.....	113
	REFERÊNCIAS.....	117
	APÊNDICE A - CO-VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TIMOL A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	129

1 INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas mundialmente pela população há milhares de anos como alternativa para tratar diversas patologias em decorrência das atividades bioativas exercidas por muitas espécies (SOUSA et al., 2008; CUNHA et al., 2016). Essas atividades biológicas são derivadas de compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas (CUNHA et al., 2016) em decorrência de diversas condições ambientais, tornando esses compostos essenciais para a sobrevivência e reprodução da espécie vegetal (ROCKENBACH et al., 2018).

Os principais grupos de metabólitos secundários formados nas espécies vegetais são os terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (CUNHA et al., 2016; ROCKENBACH et al., 2018). Os terpenos são constituídos de ligações de unidades isoprênicas (cinco carbonos), dando origem aos grupos: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenes, triterpenos e tetraterpenos, que diferem entre si pela quantidade de átomo de carbono em sua estrutura (SOUZA, 2008; FELIPE; BICAS, 2017). Os monoterpenos e sesquiterpenos, devido ao menor tamanho de suas cadeias carbônicas, com 10 e 15 carbonos, respectivamente, apresentam propriedades de volatilização e, desta forma, são os principais constituintes dos óleos essenciais (FEHLBERG, 2011; ALMEIDA, 2015).

Por sua vez, os óleos essenciais são substâncias apolares, líquidas, levemente amareladas ou incolores, termolábeis, com odor característico, extraídas de uma variedade de plantas (DAMASCENO, 2007). A composição dessas substâncias voláteis sofre interferência de diversos fatores, como alterações climáticas, mudanças ambientais ou até mesmo a forma de cultivo (RAI et al., 2017). Os óleos essenciais possuem diversas atividades biológicas já comprovadas e, devido a isso, despertam o interesse de indústrias farmacêuticas, alimentícias, agroquímicas e cosméticas (ALMEIDA et al., 2015; MOREIRA et al., 2015).

Dentre a diversidade de óleos essenciais existentes na natureza, encontra-se o óleo essencial derivado da família Lamiaceae, *Thymus vulgaris*, mais popularmente conhecido como óleo essencial de tomilho (BERWICK, 1996). Este óleo possui atividades farmacológicas já comprovadas, dentre elas a atividade antifúngica (ASPREA et al., 2017), devido a presença dos monoterpenos timol e carvarol em sua composição (FLORES, BECK, SILVA, 2016; ASPREA et al., 2017). Apesar do popular consumo dos óleos essenciais pelo mundo, esses compostos apresentam características inconvenientes que podem dificultar sua utilização, como a alta volatilidade, baixa polaridade, odores fortes e muitas vezes desagradáveis, além de sua instabilidade frente ao calor e umidade (DAMASCENO, 2007).

Como alternativa para controlar essas desvantagens dispomos de carreadores com dimensões nanométricas para veiculação de substâncias, denominados sistemas nanoestruturados.

Os sistemas nanoestruturados são caracterizados por apresentarem tamanho inferior a 1 μm . Este tamanho reduzido proporciona diversas vantagens ao contornar problemas apresentados por determinadas substâncias ativas, como aumentar a superfície de contato e, deste modo, favorecer as atividades bioativas; proporcionar o aumento da solubilidade de substâncias apolares; mascarar odor e sabor e controlar a liberação dos componentes a eles associados (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; HUYNH et al., 2009; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010). O tipo de nanocarreador utilizado depende das propriedades físico-químicas das substâncias em estudo e da via de administração, de modo que possibilite sua aplicação. Desde modo, os principais sistemas para incorporação de substâncias de interesse farmacêutico são os lipossomas (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007), as nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas) (CONTRI et al., 2014), as nanopartículas lipídicas (nanopartícula lipídica sólida e carreador lipídico nanoestruturado) (CHEN et al., 2014) e as nanoemulsões (BOUCHEMAL et al., 2004).

As nanoemulsões, sistema nanoestruturado utilizado neste trabalho, são formadas pela mistura de dois líquidos imiscíveis estabilizados por agentes emulsionantes, sendo estes os responsáveis por diminuir a tensão interfacial entre as fases do sistema (PEREIRA, 2011; PISOSCHI et al., 2018; PRAKASH et al., 2019). Esses sistemas podem ser formados por dois processos: métodos que empregam baixa energia de emulsificação a partir da energia química pertencente ao sistema ou que utilizam alta energia de emulsificação, fornecendo energia mecânica ao sistema (BRUXEL et al., 2012). As gotículas formadas apresentam tamanho na faixa de 100 a 600 nm (POHLMANN et al., 2013).

Levando em consideração o exposto, este trabalho visou estudar o desenvolvimento tecnológico de nanoemulsões para a veiculação do óleo essencial de tomilho, excluindo a utilização de altas temperaturas e o emprego de solventes orgânicos, a partir de um método rápido e econômico, visando explorar sua acentuada atividade antifúngica sem a associação com substâncias sintéticas para possível aplicação no tratamento tópico de infecções fúngicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e otimizar nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) empregando método de alta energia de emulsificação e avaliar aspectos relacionados à estabilidade, liberação *in vitro* e atividade antifúngica das formulações desenvolvidas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar e quantificar os componentes voláteis do óleo essencial de tomilho;
- Realizar um estudo de pré-formulação utilizando um delineamento composto central;
- Preparar nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho;
- Avaliar as características físico-químicas das formulações em relação ao diâmetro médio de gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e teor de timol;
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanoemulsões armazenadas à 5 e 25 °C por até 100 dias;
- Avaliar a abundância dos componentes voláteis do óleo essencial de tomilho no *headspace* das nanoemulsões desenvolvidas após serem armazenadas à temperaturas de 5, 20 e 40 °C por 30 dias como preditivo de estabilidade das formulações;
- Avaliar a influência da temperatura na atividade antifúngica das nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho, após submeter as amostras às temperaturas de 5, 20 e 40 °C, por um período de 30 dias;
- Avaliar a liberação *in vitro* do timol a partir das nanoemulsões.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS E METABOLISMO VEGETAL

A utilização de plantas na cultura mundial é datada deste o início da civilização, pois o homem desde o começo da história as utilizavam para fins medicinais (CARNEIRO et al., 2014). Mesmo com o passar dos anos, este recurso natural é ainda explorado e estudado devido a variedade de atividades biológicas presentes nesses vegetais, sendo este interesse comum em diferentes áreas, como farmacêuticas, cosméticas, alimentícias e agroquímicas (ATHAYDES, 2010).

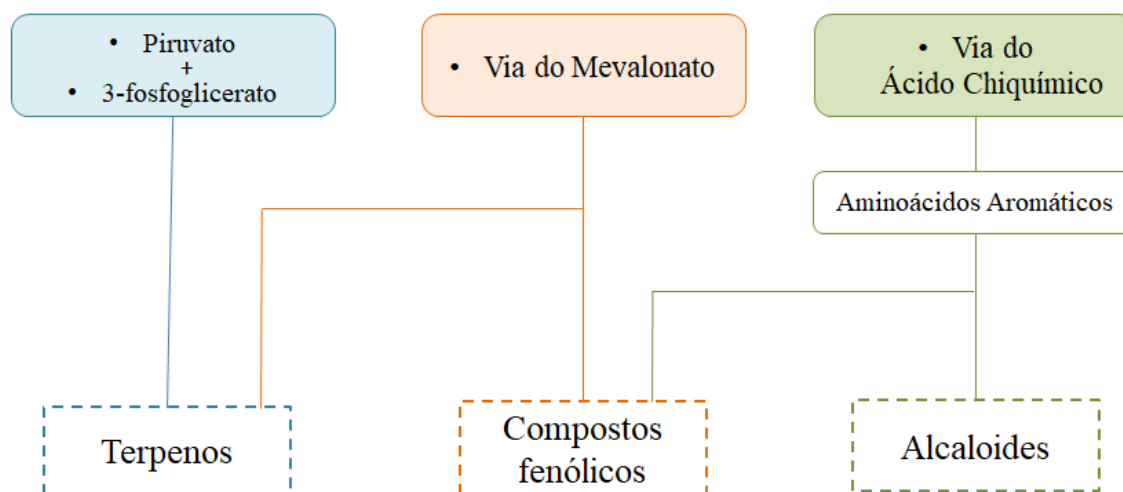
As plantas fazem parte da biodiversidade, sendo que o Brasil detém 20% da biodiversidade mundial, tornando-se o país com maior diversidade de espécies do mundo. Toda essa riqueza vegetal está disposta em seis biomas terrestres contabilizando, aproximadamente, 43.020 espécies vegetais conhecidas no país (BRASIL, 2019). Com o patrimônio genético nacional tão rico, diversas pesquisas científicas com plantas vem sendo realizadas, objetivando explorar positivamente os bioativos presentes nas espécies vegetais (CARNEIRO et al., 2014).

Diversas substâncias bioativas são responsáveis pela atividade biológica dos vegetais, substâncias estas proveniente da biossíntese do metabolismo vegetal das plantas (CUNHA et al., 2016). O metabolismo vegetal, definido como o conjunto de reações químicas que ocorre permanentemente em cada célula, gera compostos químicos transformados ou degradados, denominados metabólitos. Os metabólitos compreendem dois grupos: os metabólitos primários, que são indispensáveis à vida e comum ao seres vivos, e os metabólitos secundários, que são compostos sintetizados sem caráter essencial, mas que asseguram vantagens para o desenvolvimento e permanência da planta no meio ambiente, atuando como mecanismo de defesa, protegendo das mudanças de temperatura, exposição a luz e raios ultravioletas, níveis de água e até mesmo na deficiência de alguns minerais, além de repelir predadores. Estes metabólitos secundários são normalmente substâncias de baixo peso molecular, encontradas em baixas concentrações e com atividades farmacológicas pronunciadas (STEFFENS, 2010; SILVA, 2013; ROCHA, 2013).

A partir do metabolismo secundário vegetal há a formação de três grandes grupos: terpenos (com origem a partir do ácido mevalônico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato), compostos fenólicos (derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico) e os alcaloides

(com origem dos aminoácidos aromáticos, como o triptofano e a tirosina) (ROCHA, 2013; TEIXEIRA, 2017), como ilustra a Figura 1.

Figura 1 – Principais vias do metabolismo secundário das plantas



Fonte: (Adaptação de TEIXEIRA, 2017, p. 20).

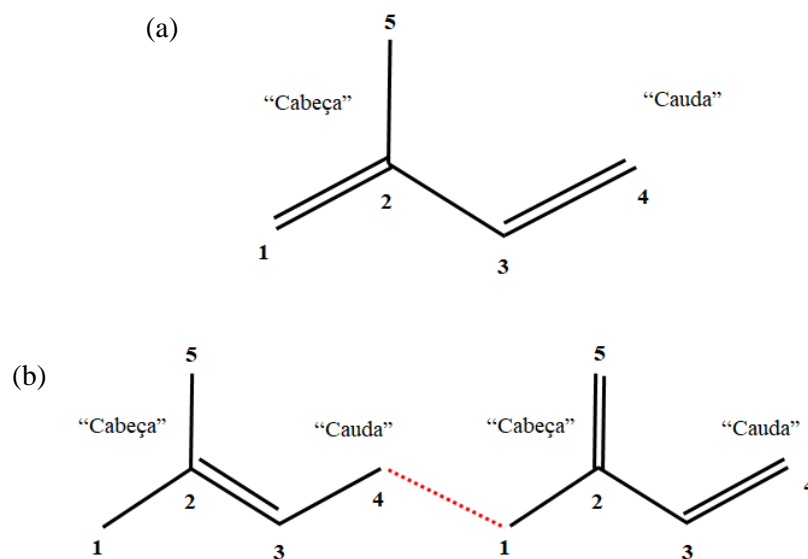
Tendo em vista que a abordagem principal e o material de estudo deste trabalho foi a utilização de um óleo essencial para o desenvolvimento de nanoemulsões, é importante destacarmos a origem terpênica e fenilpropanóide dessas substâncias voláteis.

3.1.1 Terpenos

Os terpenos são um dos principais grupos formados a partir do metabolismo secundário das plantas. Estes compostos apresentam uma dupla ligação carbono-carbono, caracterizando-se como um hidrocarboneto insaturado. Existem terpenos que possuem em sua estrutura moléculas de oxigênio, estes passam a ser denominados terpenoides. Sua constituição se baseia em unidades de isoprenos (cinco carbonos) que se ligam por ligação 1 – 4 (“cabeça-cauda”) conforme ilustrado na Figura 2. Existem terpenos que formam ligações químicas diferentes, como é o caso do β -caroteno, considerado um terpeno irregular, pois as unidades de isoprenos são unidas por ligação 4 – 4. Outros terpenos se unem por ligações cruzadas, no caso de terpenos cíclicos, como o limoneno (FELIPE; BICAS, 2017).

A ligação das estruturas isoprênicas possibilita a formação dos grupos de terpenos, sendo eles, hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenes (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (PETERSEN, 2006; JAKIEMIU, 2008; SOUZA, 2008; FELIPE; BICAS, 2017).

Figura 2 – Representação da (a) estrutura química do isopreno (C_5H_8) e (b) ligação 1 – 4 (“cabeça-cauda”) de isoprenos

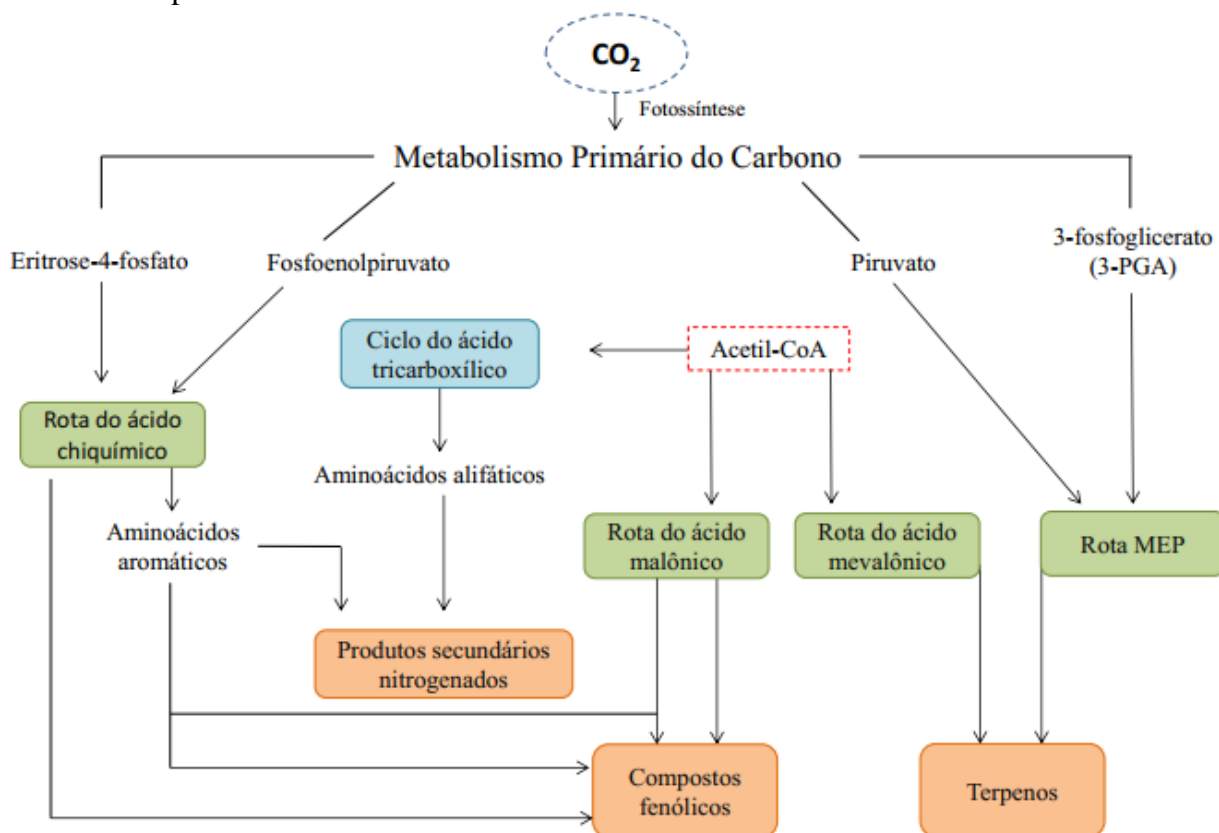


Fonte: (Adaptação de FELIPE; BICAS, 2017, p. 122).

Os terpenos podem ser sintetizados por duas rotas metabólicas, a partir da via mevalonato (MVA) ou da via metileritritol fosfato (MEP), proveniente do piruvato e 3-fosfoglicerato, como é possível observar na Figura 3.

A síntese dos terpenos a partir da via do MVA em plantas, ocorre no citoplasma e na mitocôndria. Esse processo se inicia pela condensação de três moléculas de acetil-CoA que após a atividade da enzima HMG-CoA-sintase, forma o éster 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Este produto é então reduzido pela enzima HMG-CoA redutase para produzir MVA. Em sequência o MVA é convertido a mevalonato-5-fosfato (MVAP) pela enzima MVA quinase e, após, a MVAP é fosforilada, agora pela enzima MVAP quinase, para produzir o mevalonato-5-difosfato (MVAPP). A enzima MVAPP descarboxilase converte o MVAPP em isopentil-pirofosfato (IPP). Esta molécula sofre isomerização e é convertida em dimetilalil pirofosfato (DMAPP) pela enzima IPP isomerase. A condensação dessas duas moléculas origina geranylpirofosfato, pela ação da enzima preniltransferase, sendo esse o precursor de todos os isoprenóides (JAKIEMIU, 2008; SOUZA, 2008; ATHAYDES, 2010).

Figura 3 – Ilustração das rotas metabólicas precursoras dos metabólitos secundários das plantas

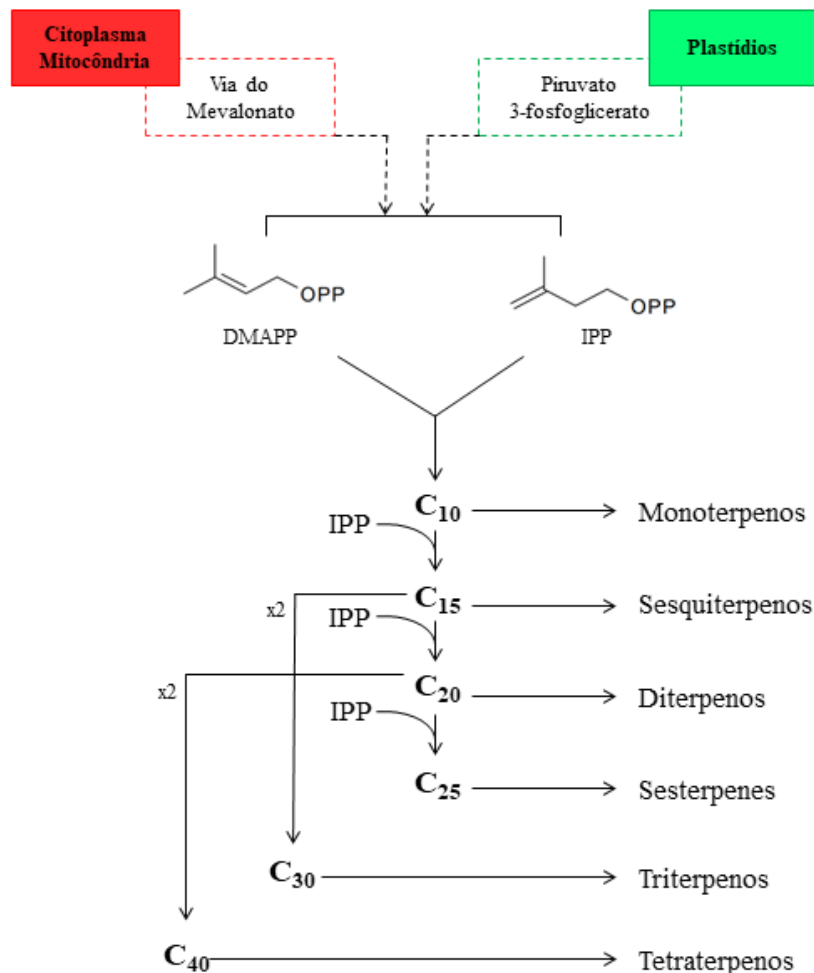


Fonte: (Adaptação de SOUZA, 2008, p. 100).

Outra rota que sintetiza terpenos em uma variedade de plantas é a via do metileritritol fosfato (MEP) (DUBEY; BHALLA; LUTHRA, 2003). O piruvato e o 3-fosfoglicerato (3-PGA) são os precursores desta via e as enzimas que realizam as reações localizam-se nos plastídios. A condensação destes compostos a 1-desoxixilulose-5-fosfato (DXP) pela enzima DXP sintase é a reação de início dessa rota bioquímica para formação dos terpenos. Em seguida, a enzima DXP redutoisomerase catalisa a reação convertendo DXP em MEP que posteriormente sofre ação da enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase e é transformado em 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol (CDP-ME). Seguindo a rota, ocorre a fosforilação da CDP-ME pela enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol quinase (CMK) dando origem a 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-ME2P), a qual é substrato para a formação de 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (ME-cPP) pela enzima ME-cPP sintase. A rota chega ao fim quando a molécula anterior é convertida a IPP e DMAPP por meio do intermediário 1-hidroxi-2C-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato (HMBPP),

sendo as enzimas HMBPP sintase e HMBPP redutase as catalisadores destas reações (ATHAYDES, 2010). A Figura 4 ilustra essas duas rotas bioquímicas da síntese dos terpenos.

Figura 4 – Síntese de terpenos pela rota bioquímica do ácido mavalônico e do piruvato e 3-fosfoglicerato



Fonte: (Adaptação de PETERSEN, 2006, p. 37).

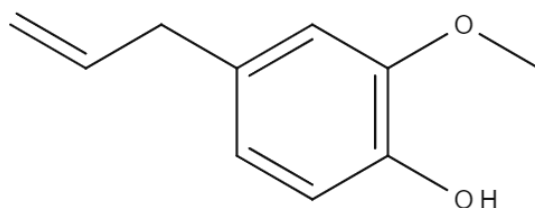
A volatilidade dos terpenos está associada ao tamanho da sua cadeia carbônica, por isso, os monoterpenos e sesquiterpenos, com 10 e 15 carbonos, respectivamente, são substâncias voláteis. Por essa característica, são mais frequentes nos óleos essenciais as unidades isoprênicas monoterpênicas (cerca de 90% dos óleos essenciais) e sesquiterpênicas (FEHLBERG, 2011; ALMEIDA, 2015). A ocorrência dos monoterpenos se dá em diferentes órgãos das plantas, podendo ocorrer em pêlos glandulares no caso da família Lamiaceae, canais oleíferos como nas Apiaceae, células parenquimáticas diferenciadas como na Lauraceae, Piperaceae e Poaceae, entre outros (SANTANA, 2013).

3.1.2 Fenilpropanóides

Os fenilpropanóides costumam ser substâncias voláteis, sendo considerados, juntamente com os monoterpenos e sesquiterpenos, constituintes dos óleos essenciais (JAKIEMIU, 2008), pois algumas espécies possuem quantidades significativas destes compostos (BIASE; DESCHAMPS, 2009).

Os derivados fenólicos também são provenientes do metabolismo secundário vegetal (VELOSO et al., 2014). Estes compostos são constituídos por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos, como por exemplo o eugenol (ROCHA, 2013), demonstrado na Figura 5.

Figura 5 – Estrutura química do fenilpropanóide eugenol

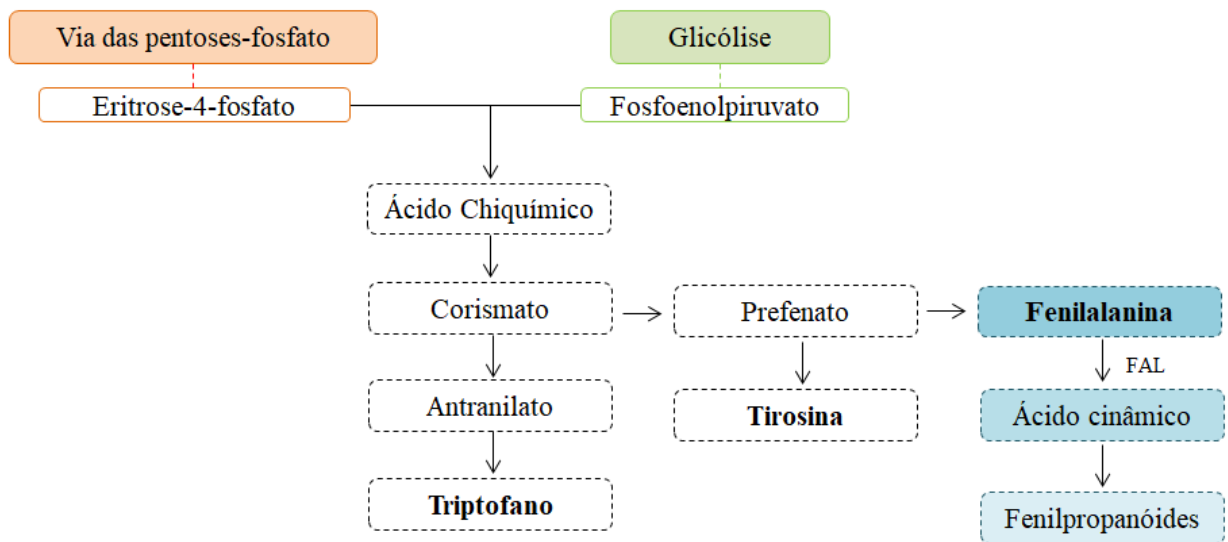


Fonte: (Próprio autor).

A obtenção deste composto ocorre pela união de dois metabólitos: o fosfoenolpiruvato (PEP) decorrente da glicólise e eritrose-4-fosfato, da via pentose-fosfato. Uma série de reações são realizadas para a formação do corismato, produto final da via do ácido chiquímico, sendo este o precursor dos três aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina e fenilalanina (JAKIEMIU, 2008) como mostra a Figura 6.

A fenilalanina perde uma molécula de amônia pela ação da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), enzima esta considerada chave da regulação da via metabólica dos fenilpropanóides, formando ácido cinâmico, o qual é a origem da biossíntese da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides (GOMES, 2011; LOPES, 2015).

Figura 6 – Metabolismo dos compostos fenólicos em plantas



Fonte: (Adaptação de LOPES, 2015, p. 37).

* FAL: Fenilalanina amônia-liase

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Formados a partir do metabolismo secundário das espécies vegetais, os óleos essenciais, também conhecidos por outras denominações como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, diferenciam-se dos óleos vegetais fixos (formados por trigliceróis provenientes normalmente de sementes) pela sua alta volatilidade (ROCHA, 2013). São formados por uma associação complexa de substâncias naturais, visto a diversidade de grupos funcionais dos seus constituintes, dentre eles, hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, ésteres, aldeídos, fenóis e éteres (LIMA et al., 2010; ALMEIDA, 2015). Os óleos essenciais são misturas aromáticas lipofílicas, que se apresentam na forma líquida, levemente amarelada ou incolor, instáveis na presença de calor e umidade, com forte odor característico, solúveis em solventes orgânicos, baixa polaridade e extraídas de diferentes partes da planta (folhas, flores, frutos e raízes) (DAMASCENO, 2007). A obtenção destes óleos se concentram normalmente em países tropicais e na região do Mediterrâneo (BAKKALI et al., 2008). A composição dos óleos pode ser afetado por diversas razões, dentre elas, mudanças ambientais e de cultivo, fazendo com que uma mesma espécie apresente diferentes composições devido a fatores como temperatura, umidade, luz, latitude e altitude (RAI et al., 2017).

Estes compostos aromáticos além de serem bastante utilizados nas indústrias cosméticas e na fabricação de perfumes, por apresentarem aromas marcantes e característicos,

também possuem atividades farmacológicas importantes, como analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antibacteriana, anticonvulsivante e inseticida (ALMEIDA et al., 2015; MOREIRA et al., 2015).

Estudos vem sendo realizados com diversos óleos essenciais na busca de alternativas para novas terapias farmacológicas e emprego em outras áreas de interesse. Khaleque e colaboradores (2016) analisaram a ação dos óleos essenciais de cravo (concentração de 5 e 10%) e canela (concentração 2,5 e 5%) na inativação da bactéria patogênica *Listeria monocytogenes* em carne moída. Após executado o protocolo teste e obtido os resultados, foi possível verificar que a utilização do óleo de cravo a 10%, aliado a outros métodos de conservação, como por exemplo a refrigeração, pode favorecer o controle de patógenos em produtos cárneos.

Flores e colaboradores (2015) investigaram a atividade antifúngica de suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* no crescimento de *C. albicans* a partir da avaliação *in vitro* do perfil de inibição da levedura após 0, 5, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. O estudo demonstrou que as nanoestruturas foram capazes de reduzir o crescimento de *C. albicans*, no entanto as nanocápsulas poliméricas reduziram e controlaram o crescimento do fungo por mais tempo, chegando a 72 horas.

Moreira e colaboradores (2016) avaliaram, por meio de análise *in vitro*, o potencial acaricida do óleo essencial extraído de folhas do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) na mortalidade de abelhas *Apis mellifera* L. e do ácaro que parasita essas abelhas, denominado *Varroa destructor*. As análises demonstraram que o óleo essencial do alecrim-pimenta apresentou uma mortalidade progressiva significativa do ácaro, simultaneamente, uma menor mortalidade das abelhas, se apresentando como um promissor acaricida.

A fim de investigar alternativas de terapias farmacológicas, Zimath e colaboradores (2017) avaliaram o efeito do óleo essencial da planta *Piper amplum* no sistema nervoso central de camundongos fêmeas Swiss (doses de 50, 100, 150 mg/kg, v.o) e verificaram atividade antidepressiva no teste do nado forçado nas doses testadas.

Baldim e colaboradores (2019) desenvolveram sistemas lipídicos nanoestruturados contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) e investigaram sua atividade frente à *C. albicans*. Os resultados encontrados demonstraram que as formulações e o óleo essencial puro apresentaram potente atividade contra a levedura, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 156 e 312 µg/mL. Os autores sugerem que essa tecnologia é uma alternativa eficaz para melhorar a estabilidade do óleo e desenvolver sistemas antimicrobianos promissores contra agentes patógenos resistente a múltiplos fármacos.

3.2.1 Obtenção de óleos essenciais

O processo de obtenção dos óleos essenciais das plantas aromáticas se dá por diferentes métodos de extração. A escolha do método empregado é importante pois pode influenciar a composição dos óleos e haver alteração de suas características bioativas. Dependendo da localização do óleo essencial no vegetal, é escolhido o método que deve ser empregado, para que não haja influência e as características físico-químicas não sejam alteradas (BUSATO et al., 2014; JAKIEMIU, 2008). Os métodos mais comumente empregados são arraste direto por vapor d'água, hidrodestilação, extração com solventes orgânicos e extração com fluidos supercríticos (ROCHA, 2013). As técnicas de prensagem a frio e enfloração (“enflourage”) não são tão usuais, mas em alguns casos ainda são empregadas (BIASE; DESCHAMPS, 2009).

O método de arraste por vapor d'água é uma técnica relativamente mais econômica se comparada a outros métodos. Baseia-se na vaporização de temperaturas menores do que as de ebulição de cada um dos componentes por uma corrente direta de vapor d'água (STEFFENS, 2010). Na prática, o material vegetal é colocado em uma placa perfurada, esta é mantida a uma certa distância do fundo do extrator, de modo que não entre em contato com a água em ebulição e assim passe por uma corrente de vapor, condensando a mistura de vapores do óleo e da água para que ocorra a separação por diferença de densidade (JAKIEMIU, 2008). O inconveniente deste método é a possibilidade dos constituintes dos óleos sofrerem degradação térmica ou hidrólise, causando mudanças no aroma e até mesmo afetar a reprodução de fragrâncias características desses vegetais aromáticos (STEFFENS, 2010).

Outro método muito utilizado é o processo de hidrodestilação. Essa técnica é a mais difundida nas indústrias para extração de compostos voláteis (ROCHA 2013). A água e o material em ebulição ficam em contato, o vapor faz com que haja a abertura das paredes celulares e o óleo que está entre as paredes evapore juntamente com a água e se direcione para o condensador, onde acontece o resfriamento e a separação por diferença de densidade. Em escala laboratorial este processo é realizado em aparelho de Clevenger (JAKIEMIU, 2008).

A extração com solventes orgânicos permite maior extração a menores temperaturas. Esta técnica consiste em separar compostos que apresentam diferença de solubilidade. Deste modo, é necessário adicionar um solvente que seja capaz de solubilizar as substâncias e ao mesmo tempo não seja solúvel em água (ROCHA, 2013). Normalmente solventes apolares são utilizados, como por exemplo, diclorometano, éter, etanol e hexano, e devem ser cuidadosamente escolhidos, uma vez que o solvente interfere na composição, qualidade e

rendimento da extração. Esta técnica possui a desvantagem de não ser seletiva, pois além de extrair os óleos essenciais, também remove compostos lipofílicos (JAKIEMIU, 2008; ROCHA, 2013).

A obtenção dos óleos essenciais pela extração com fluido supercrítico é outra técnica atualmente utilizada. Os fluidos supercríticos caracterizam-se por serem fluidos densos não condensáveis (BRUNNER, 2004), os quais atingem o estado supercrítico quando sua pressão e temperatura são maiores que seus valores críticos (ABAIDE, 2016). Para melhor compreensão, define-se temperatura crítica sendo a mais alta temperatura na qual um gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão, e pressão crítica é a mais alta pressão na qual um líquido pode ser convertido a um gás pelo aumento de temperatura (PEREIRA, 2015). O estado supercrítico é obtido por meio do aumento simultâneo da temperatura e da pressão da substância, modificando a aglomeração entre as moléculas e, desta forma, a densidade da substância é alterada. Assim, o poder de solvatação é modificado, alterando o comportamento químico da mesma (ROCHA, 2013). O solvente mais utilizado é o dióxido de carbono por apresentar menor custo, estar facilmente disponível e ser considerado mais seguro, mas existem outros que podem ser utilizados, como hexano, butano, pentano, óxido nitroso (ABAIDE, 2016). Essa técnica associa algumas vantagens, como a facilidade do solvente ser removido do soluto a partir da redução de pressão e ajuste de temperatura, além de ser um processo relativamente rápido por causa da baixa viscosidade e emprega pouco ou nenhum solvente orgânico (PEREIRA, 2015). O alto custo do processo é a única desvantagem para implementação da técnica (JAKIEMIU, 2008).

A técnica de prensagem a frio é normalmente utilizada para extração de óleos essenciais cítricos, como o de laranja. Neste processo, as frutas são prensadas e então extraídos tanto o suco como o óleo essencial. Após, é realizada a decantação, centrifugação ou destilação fracionada para a obtenção dos compostos voláteis. Já a técnica de enfloração extrai os óleos a partir da deposição manual de pétalas ou flores sobre placas de gordura, em temperatura ambiente e por um determinado período de tempo, já que a gordura possui uma grande capacidade de absorver os constituintes voláteis. Esta operação se repete até que a camada de gordura esteja completamente saturada e seja retirada com auxílio de espátulas. Em seguida, o material contendo a gordura e o óleo é derretido e armazenado. Para extrair o óleo da matriz gordurosa utilizam-se solventes. Essa extração é utilizada para flores que continuam suas atividades fisiológicas com produção de óleo essencial por um certo período de tempo, como o jasmim (BIASE; DESCHAMPS, 2009).

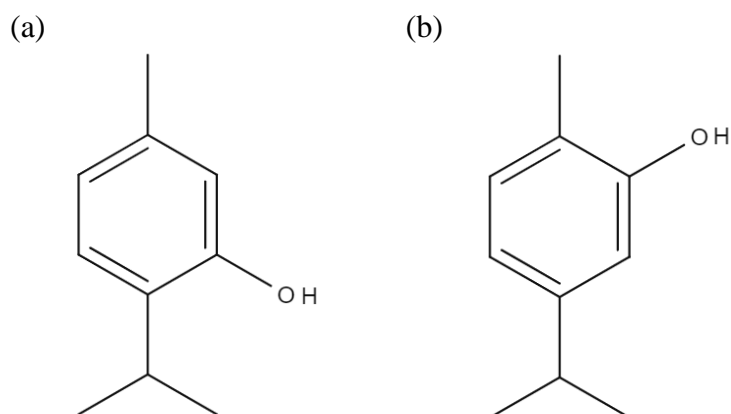
3.2.2 Óleo essencial de *Thymus vulgaris* L.

A planta popularmente conhecida como tomilho e cientificamente denominada *T. vulgaris* é uma planta aromática, já usada pelas antigas civilizações como planta medicinal, além de ser também utilizada na culinária (ROCHA et al., 2012). Pertencente a família botânica Lamiaceae, possui cerca de 150 gêneros e, aproximadamente, 2800 espécies distribuídas mundialmente, sendo a região do Mediterrâneo o maior centro de dispersão desta planta (JAKIEMIU et al., 2010). O *T. vulgaris* se desenvolve na forma de um subarbusto perene, ereto, ramificado, atingindo no máximo 50 cm de altura, com os ramos cobertos por folhas simples, pequenas, verde escuras, com formato oval, apresentando entre 6-12 mm de comprimento e suas flores são brancas ou lilás (ROCHA, 2013; LIMA. W., 2018). Pode-se destacar a sálvia (*Salvia officinalis*), o manjericão (*Ocimum basilicum*), o orégano (*Origanum vulgare* L.) e a manjerona (*Origanum majorana* L.) como espécies também pertencentes a essa família (ROCHA et al., 2012; ROCHA, 2013).

O tomilho é utilizado pela população como aditivo alimentar, como conservante de alimentos e, devido as suas propriedades biológicas, está sendo cada vez mais explorado seus benefícios medicinais (OLIVEIRA, 2016). Na literatura científica diversas atividades farmacológicas deste óleo são relatadas, como atividades antimicrobiana, antibacteriana, antioxidante, expectorante, pesticida, anti-espasmódica e carminativa (JAKIEMIU et al., 2010; ROCHA et al., 2012; ASPREA et al., 2017).

Como principal abordagem deste trabalho, a atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho está relacionada com a presença de timol e carvacrol (ROCHA et al., 2012; ROCHA, 2013; FLORES, BECK, SILVA, 2016; ASPREA et al., 2017), cujas estruturas químicas podem ser visualizadas na Figura 7.

Figura 7 – Estrutura química dos compostos timol (a) e carvacrol (b)



Fonte: (Próprio autor).

O timol, também conhecido por 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol, e seu isômero carvacrol, com a denominação de 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol, diferem estruturalmente apenas pela posição do grupo hidroxila no anel fenólico (ALMEIDA, 2015). Ambos são monoterpenos, possuem a mesma fórmula molecular ($C_{10}H_{14}O$) e peso molecular de 150,22 g/mol (NIST, 2019); entretanto, o timol apresenta-se como um pó branco cristalino, em temperatura ambiente e o carvacrol na mesma temperatura apresenta-se na forma líquida (ALMEIDA, 2015; MORAES, 2015). O timol apresenta baixa solubilidade em água e baixa palatabilidade, isso devido ao seu sabor e odor desagradáveis (MARCHESE et al., 2016).

O óleo essencial de tomilho está sendo cada vez mais estudando em diferentes áreas de interesse. Em 2007, Santoro e colaboradores investigaram o efeito dos óleos essenciais de orégano e tomilho contra o parasita *Tripanossoma cruzi*. Os testes foram realizados com cultura de epimastigotas e tripomastigotas da corrente sanguínea, que foram incubados por 24 horas com diferentes concentrações dos óleos essenciais. Os dados encontrados foram referentes à concentração inibitória 50 (IC_{50}) determinada pela contagem celular. Ambos os óleos apresentaram atividade contra o parasita, sendo que o óleo de tomilho apresentou uma maior atividade, pois apresentou IC_{50} menor. Este trabalho abriu perspectivas para o estudo mais aprofundado de novas substâncias de origem vegetal para o tratamento de doenças parasitárias.

Em 2014, Giarratana e colaboradores investigaram a atividade larvicida do óleo essencial de tomilho no tratamento da doença anisakiase, causada a partir da ingestão de frutos do mar e peixes crus ou mal cozidos, pelo parasita da família Anisakinae. O primeiro passo dos testes *in vitro* foi manter as larvas em contato com uma solução água:vinagre (1:1),

3% de cloreto de sódio e 1% de ácido cítrico, simulando a solução marinada utilizada por diversos produtores, acrescidas de concentrações testes do óleo (0,1%, 0,5%, 1%, 5% e 10%); o segundo passo experimental foi realizado em sementes de girassol com as mesmas concentrações de óleo para reproduzir a embalagem normal pós-marinada e armazenamento que normalmente é feito com óleo. Os testes demonstraram que a concentração de 5 e 10% de óleo essencial causaram a morte de todas as larvas após 14 horas de experimento e sugerem maiores estudos na investigação do óleo e no possível processo industrial.

Nunes e colaboradores (2016) realizaram um estudo evidenciando a atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho contra isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*, responsável por causar meningoencefalite em paciente imunocomprometidos. Testes de microdiluição em caldo comprovaram a eficácia contra os isolados fúngicos, com concentrações inibitórias mínimas variando de 32 a 128 µg/mL; os testes de interação *in vitro* do óleo e fluconazol demonstraram não haver potencialização da atividade antifúngica do fármaco. O efeito no metabolismo celular fúngico foi, também, avaliado e os resultados mostraram alterações na atividade enzimática mitocondrial apenas em concentrações > 1.024 µg/mL e os resultados da ação do óleo em eritrócitos humanos indicaram que ele possui baixa atividade citotóxica. Esses resultados mostram potencialmente este óleo como uma alternativa para o tratamento da criptococose.

Reyes-Jurado e colaboradores (2019) verificaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais comerciais de orégano (*Lippia berlandieri*), tomilho (*T. vulgaris*) e mostarda (*Brassica nigra*) contra uma série de bactérias e fungos por meio do teste de difusão em fase de vapor por cromatografia gasosa, na qual os microrganismos testados foram expostos aos vapores dos óleos essenciais e os resultados expressos como concentrações inibitórias mínimas (CIMs). Os óleos apresentaram atividade antimicrobiana significativa, com CIMs na faixa de 0,012 a 1 µg/mL, sugerindo que os óleos testados podem ser usados para proteger alimentos embalados contra o crescimento de microrganismos.

Apesar do consumo *in natura* das plantas aromáticas e da utilização de seus óleos essenciais em todo mercado nacional e internacional (BRITO; PEREIRA; AMARAL, 2006), existem desvantagens associadas ao emprego desses óleos voláteis que impossibilitam ou reduzem sua utilização, como, por exemplo, a alta volatilidade, instabilidade frente ao calor, baixa solubilidade, odor desagradável (DAMASCENO, 2007). Deste modo existem tecnologias que proporcionam minimizar esses inconvenientes, como os sistemas nanoestruturados, possibilitando sua utilização de forma ampla em diversas áreas.

3.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

A nanotecnologia, definida como a manipulação da matéria, envolvendo modificações físicas e químicas para produzir materiais em nanoescala (SIMONAZZI et al., 2018), tem apresentado seus potenciais, beneficiando diversos segmentos, como alimentício, eletrônico, agricultura, medicina, no âmbito médico-hospitalar, estética e produtos farmacêuticos (PASCHOALINO, MARCONE, JARDIM, 2010; CHHIPA, 2017).

Dentre os materiais nanotecnológicos, encontram-se os sistemas nanoestruturados, que são carreadores nanométricos de compostos bioativos ou substâncias ativas. Esses sistemas apresentam tamanho inferior a 1 μm , proporcionando o aumento da superfície de contato e favorecendo as atividades das substâncias em seus alvos. Essa tecnologia pode ser utilizada como uma alternativa para minimizar desvantagens apresentadas por algumas substâncias ativas, uma vez que proporcionam o aumento da solubilidade de substâncias lipofílicas, contornam instabilidades frente a luz, calor e oxidação, mascaram odores e sabores, controlam a liberação das substâncias e diminuem a toxicidade (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; HUYNH et al., 2009; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010).

Dentre os principais sistemas nanoestruturados para incorporação de bioativos encontram-se os lipossomas (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007), as nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) (CONTRI et al., 2014), as nanoemulsões (BOUCHEMAL et al., 2004) e as nanopartículas lipídicas (nanopartícula lipídica sólida e carreador lipídico nanoestruturado) (CHEN et al., 2014).

Os lipossomas, representado na Figura 8 (a), possuem caráter anfifílico, uma vez que são organizados por bicamadas lipídicas ao redor de um núcleo aquoso, no qual os componentes hidrofílicos podem ficar confinados e os compostos lipofílicos podem ser encapsulados na bicamada de lipídios. Esses sistemas podem incorporar substâncias lipofílicas, hidrofílicas ou até mesmo anfifílicas (MATOS; LUCCA; KOESTER, 2018).

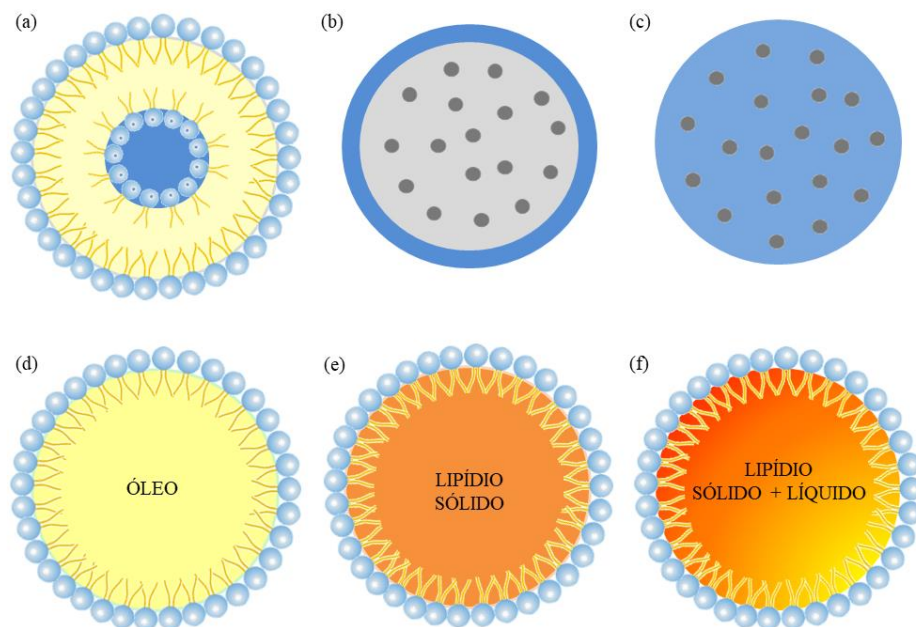
As nanopartículas poliméricas incluem as nanocápsulas e nanoesferas, que diferem entre si pela composição e disposição estrutural (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003). As nanocápsulas [Figura 8 (b)] são sistemas vesiculares, na qual sua cavidade consiste de um núcleo oleoso ou aquoso envolto por uma camada polimérica. Os princípios ativos podem ficar então dispersos nesse núcleo ou adsorvidos na parede polimérica (LIMA. R., 2017; MATOS; LUCCA; KOESTER, 2018). Já as nanoesferas [Figura 8 (c)], são formadas por uma matriz polimérica onde o fármaco ou bioativo pode ficar retido ou adsorvido na estrutura (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003; LIMA. R., 2018).

As nanoemulsões [Figura 8 (d)], por sua vez, são dispersões compostas por uma fase dispersa em outra, podendo ser formadas nanoemulsões óleo/água ou água/óleo. Nesses sistemas não há o emprego de polímeros (ASSIS et al., 2012).

Outros nanocarreadores que compõem os sistemas nanoestruturados são as nanopartículas lipídicas sólidas, demonstrada na Figura 8 (e), na qual possuem o núcleo composto por lipídeos sólidos a temperatura ambiente. Os mais utilizados compreendem triglicerídeos, ácidos graxos, esteróis e ceras (TAVEIRA, 2009; ASSIS et al., 2012). Já os carreadores lipídicos nanoestruturados, Figura 8 (f), diferem do anterior pela incorporação de um lipídio líquido (óleo) juntamente com o lipídio sólido (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

Considerando as vantagens oferecidas pelas substâncias veiculadas aos nanocarreadores e pelo tipo de sistema nanoestruturado que compõe este estudo, esta revisão terá como foco as nanoemulsões.

Figura 8 – Representação esquemática dos sistemas nanoestruturados (a) lipossoma (b) nanocápsula (c) nanoesfera (d) nanoemulsão (e) nanopartícula lipídica sólida (f) carreador lipídico nanoestruturado



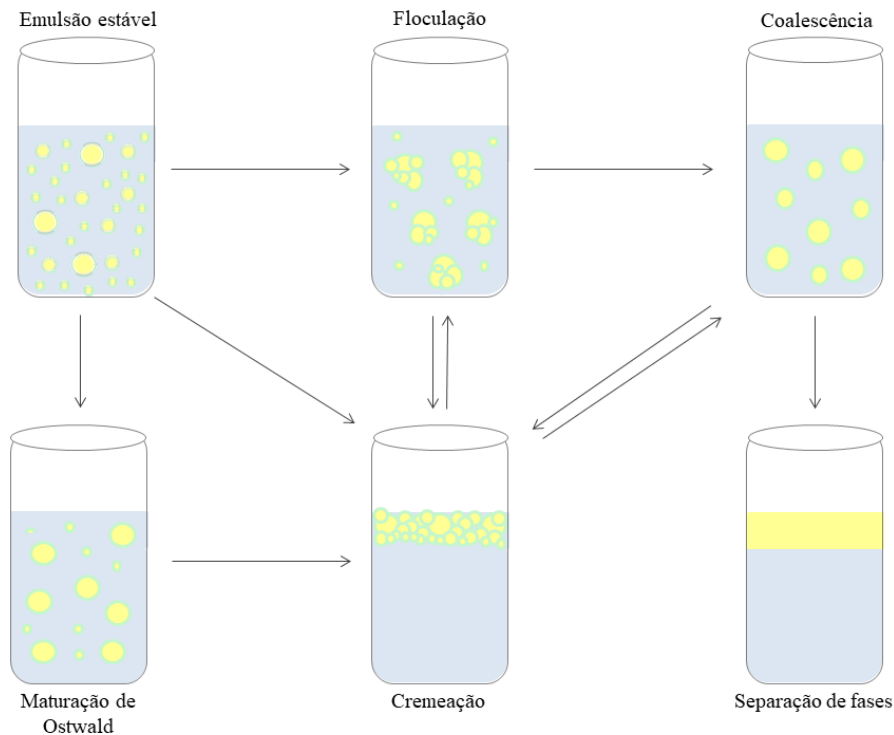
Fonte: (Próprio autor).

3.3.1 Nanoemulsões

As nanoemulsões são sistemas que apresentam tamanho de gotículas na faixa nanométrica, entre 100 e 600 nm (POHLMANN et al., 2013), formadas pela mistura de dois líquidos imiscíveis, na qual uma fase está dispersa na outra, podendo ser formadas emulsões óleo/água (O/A) ou água/óleo (A/O) (PISOSCHI et al., 2018). Com a função de diminuir a tensão interfacial entre as duas fases, são utilizadas substâncias denominadas tensoativos, que favorecem a estabilidade cinética ao formarem um filme ao redor das gotículas da fase dispersa, estabilizando o sistemas e prevenindo os fenômenos de instabilidade (PEREIRA, 2011).

Dentre os fenômenos de instabilidade que podem ocorrer com as nanoemulsões, a floculação, cremação, coalescência e maturação de Ostwald são os mais observados (FRONZA; CAMPOS; TEIXEIRA, 2004; PEREIRA, 2011; BRUXEL et al., 2012). Caracterizada por apresentar uma força de atração superior a força de repulsão, a floculação apresenta uma adesão mútua dos glóbulos da fase dispersa, porém, esse fenômeno é reversível, pois mantém a integridade individual do sistema (WILD, 2010; PEREIRA, 2011; BRUXEL et al., 2012). Na cremação ocorre a união e migração das gotículas para a superfície da nanoemulsão. Este fenômeno acontece pela diferença de densidade das fases, ocasionando a separação das mesmas. Este problema pode ser facilmente resolvido pela agitação do sistema. Por outro lado, a coalescência decorre da proximidade das gotículas ao ponto de comprometerem a estrutura das suas interfaces e, deste modo, causar a união das gotículas em gotas maiores, o que torna esse fenômeno irreversível, pois as gotículas perdem a individualidade quando se tornam uma gota única (PEREIRA, 2011; BRUXEL et al., 2012). Para completar o grupo dos fenômenos possíveis de acontecerem nas nanoemulsões, o amadurecimento de Ostwald consiste no aumento do raio da gotícula e, conseqüentemente, a diminuição do número total de gotas dispersas (FRANZOL; REZENDE, 2015). Para melhor compreensão, esses fenômenos de instabilidade estão demonstrados na Figura 9. Além dos fenômenos já descritos, instabilidades decorrentes de outras fontes são, também, observadas, como as instabilidade física (agitação, temperatura, congelamento/descongelamento) e química (pH, eletrólitos ou oxidação dos lipídios), além de possível contaminação microbiológica (BRUXEL et al., 2012).

Figura 9 – Fenômenos de instabilidade das nanoemulsões



Fonte: (Adaptação de MEIRELLES, 2016, p. 17).

3.3.1.1 Métodos de obtenção das nanoemulsões

As nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis que não se formam espontaneamente, sendo necessária a transferência de energia ao sistema. As nanoemulsões podem ser preparadas a partir de métodos de baixa energia de emulsificação, fazendo uso de energia química armazenada no sistema, e alta energia de emulsificação, que utilizam dispositivos mecânicos (PEREIRA, 2008; PEREIRA, 2011; BRUXEL et al., 2012).

3.3.1.1.1 Métodos de baixa energia de emulsificação

As nanoemulsões obtidas a partir de métodos de baixa energia de emulsificação consistem na utilização das propriedades físico-químicas do sistema para obtenção de gotículas nanométricas a partir da mudança espontânea de curvatura do tensoativo (PEREIRA, 2008; ROSANI, 2011). As técnicas relatadas utilizando esta metodologia incluem a emulsificação espontânea e emulsificação por inversão de fases, decorrente da mudança de

temperatura ou composição do sistema (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008; PEREIRA, 2011; BORTHAKUR et al., 2016).

Na emulsificação espontânea, a nanoemulsão é formada pela mistura de uma fase orgânica, composta pelo óleo e solvente orgânico miscível em água, e uma fase aquosa, contendo tensoativo hidrofílico e água. A emulsão óleo/água é formada imediatamente após verter a fase orgânica na fase aquosa em constante agitação magnética devido a difusão do solvente orgânico na fase dispersante, formando gotículas na escala nanométrica. Após o período de equilíbrio do sistema, o solvente orgânico é removido em evaporador rotatório. Alguns fatores podem afetar a formação das nanogotículas, como a natureza do solvente orgânico empregado e sua miscibilidade com a água; viscosidade do óleo e o equilíbrio dos tensoativos utilizados (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008).

A emulsificação por inversão de fases pode ocorrer em temperatura constante havendo variação apenas da composição (*phase inversion composition* – PIC) ou mantendo a composição do sistema fixa e variando a temperatura (*phase inversion temperature* – PIT) (PEREIRA, 2011). A obtenção de nanoemulsões pela técnica de PIC, a inversão das fases ocorre por mudança na formulação, como alterações em alguns parâmetros, como por exemplo, nas propriedades físico-química dos tensoativos (na fase orgânica ou na fase aquosa) mudando a afinidade dos tensoativos pelas fases ou até mesmo mudança na razão água/óleo (BORRIN, 2015). A técnica de PIT consiste na utilização de tensoativos que são sensíveis a temperatura, como os tensoativos não-iônicos. Os tensoativos polietoxilados são os mais utilizados nessa metodologia, pois os grupos etoxilas são os responsáveis pelo caráter hidrofílico do tensoativo e em baixas temperaturas esses grupamentos são mantidos, havendo a formação de emulsões óleo/água; já em altas temperaturas ocorre a desidratação das cadeias de polioxiétileno, tornando-o lipofílicos e formando emulsões água/óleo (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008; MEZADRI, 2010). Os problemas encontrados por esta técnica estão na necessidade de altas concentrações de tensoativos e por não ser possível aplicar aos tensoativos iônico e não-iônico do tipo glicosídeo (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008).

3.3.1.1.2 Métodos de alta energia de emulsificação

Os processos para formação de nanoemulsões utilizando a técnica de alta energia normalmente iniciam-se pela mistura da fase oleosa e aquosa, dando origem a uma emulsão grosseira com gotículas micrométricas. Essas emulsões formadas são então forçadas a passar

por sistemas com altas forças de cisalhamento, possibilitando a redução do tamanho médio das gotículas. Isto ocorre porque a alta energia mecânica empregada é maior do que a força de equilíbrio das gotículas, gerando forças que podem quebrá-las, superando as diferenças de pressão da fase interna e externa, denominada pressão de Laplace (KOURNIATIS; SPINELLI, MANSUR, 2010; GOTO, 2011; BORRIN, 2015).

Os homogeneizadores de alta velocidade, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e ultrassonicadores são os principais equipamentos que geram energia mecânica e alta tensão de cisalhamento utilizados nessa técnica (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008; MEZADRI, 2010; PEREIRA, 2011; BRUXEL et al., 2012; BORRIN, 2015).

Nos homogeneizadores de alta velocidade (como os equipamentos UltraTurrax[®]), o próprio nome já diz, consistem na homogeneização e consequente diminuição da gotícula devido a alta velocidade utilizando o princípio rotor-estator. De modo simplificado, o equipamento aspira axialmente a emulsão para dentro do cabeçote de dispersão, sendo em seguida comprimida radialmente pelas aberturas do conjunto rotor-estator. A elevada força de aceleração expõe o material a grandes forças de cisalhamento o que gera, entre o rotor e o estator, uma grande turbulência que garante a homogeneidade do sistema e diminuição da gotícula (IKA, 2019).

Os homogeneizadores de alta pressão promovem a diminuição das gotículas no momento que as mesmas são forçadas a passar pela válvula do homogeneizador. A redução da granulometria está relacionado ao número de vezes que o líquido processado passa pela válvula e pela pressão exercida, ou seja, quanto maior a reincidência da passagem pela válvula e maior a pressão exercida, menor o tamanho da gota (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008; BORRIN, 2015).

A redução do tamanho de gota utilizando os microfluidizadores consiste na utilização de uma bomba que impulsiona a passagem da emulsão grosseira para uma área de choque. Essa área consiste em microcanais que separam a emulsão em dois fluxos. Cada fluxo forma uma corrente e ambas são direcionadas para uma câmara de interação, ocorrendo a colisão dos fluxos e gerando as forças de cisalhamento, o que causa a desorganização das gotas e sua redução de tamanho (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008; BORRIN, 2015).

Outro equipamento utilizado são os ultrassonicadores, os quais geram força de cisalhamento a partir da alta intensidade das ondas ultrassônicas produzidas por uma sonda colocada dentro do recipiente com a emulsão e, deste modo, geram vibrações capazes de quebrarem e reduzirem o tamanho das gotas (BORRIN, 2015).

Na literatura existem estudos de desenvolvimento de nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho. Estes estudos unem as vantagens dos sistemas nanoestruturados com as atividades bioativas do óleo e as utilizam para aplicação nas mais diversas áreas, principalmente alimentícia. Ziani e colaboradores (2011) desenvolveram nanoemulsões contendo óleo de tomilho (5%) e óleo de milho (inibidor do amadurecimento de Ostwald) na proporção de 3:1, respectivamente. A fase oleosa (5%, p/p) foi vertida em uma fase aquosa (95%, p/p), composta por 0,5% de polissorbato 80 disperso em uma solução tampão (acetato a 10 mM, pH 4,0) e homogeneizada em misturador de alta velocidade (durante um minuto) seguido de cinco ciclos em homogeneizador de alta pressão (a 9 kPa) para redução do tamanho de gotícula. O estudo salientou a atividade antimicrobiana do óleo de tomilho e a importância do desenvolvimento da nanoemulsão para a utilização como sistema de liberação de agentes antimicrobianos na indústria alimentícia.

Chang e colaboradores (2012) prepararam nanoemulsões contendo na fase lipídica, (10%, p/p) misturas de diferentes proporções de óleo de tomilho associado a um inibidor de amadurecimento de Ostwald (óleo de milho e triglicerídeos de cadeia média – TCM), de 0 a 100%). A fase oleosa foi então misturada a fase aquosa (90%, p/p), composta por 1% de polissorbato 80 disperso em uma solução tampão aquosa (tampão citrato 5 mM, pH 3,5), homogeneizada em alta velocidade, por dois minutos, e, posteriormente, foram realizados cinco ciclos em homogeneizador de alta pressão, a 10 kPa. Os resultados do estudo sugeriram que o TCM é mais eficaz do que o óleo de milho, uma vez que foi necessário 50% e 60% em peso, do TCM e do óleo de milho, respectivamente, para não permitir o aumento do diâmetro das gotículas e, deste modo, inibir o amadurecimento de Ostwald. Os autores investigaram a atividade antimicrobiana da formulação e constataram que a incorporação dos inibidores de maturação, principalmente TCM, diminuíram a atividade antimicrobiana das nanoemulsões frente à levedura de deterioração *Zygosaccharomyces bailii*. Segundo os pesquisadores os resultados obtidos neste trabalho são de grande relevância para aplicações das nanoemulsões como sistemas de liberação de antimicrobianos, principalmente na indústria de alimentos.

Acevedo-Fani e colaboradores (2015) avaliaram as propriedades físicas, químicas e microbiológicas de filmes comestíveis desenvolvidos a base de alginato a partir de nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho, capim-limão e sálvia. As nanoemulsões foram preparadas a partir da mistura de uma dispersão de alginato, glicerol (2%, v/v), polissorbato 80 (3%, v/v) e os óleos essenciais (1%, v/v) em um homogeneizador de alta velocidade (17.500 rpm, por dois minutos) e, após, em microfluidizador (três ciclos a 150 MPa, temperatura inferior a 15 °C). A partir dos resultados verificou-se que os filmes que

continham o óleo de tomilho em sua composição apresentaram maior atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Sendo assim, o estudo demonstrou a possível utilização de nanoemulsões contendo óleos essenciais para a formação de filmes comestíveis com diferentes propriedades físicas e funcionais.

Chang e colaboradores (2015) investigaram a influência de arginato láurico (tensoativo catiônico) nas propriedades físicas e na eficácia antimicrobiana de nanoemulsões contendo óleo de tomilho. A preparação das nanoemulsões ocorreu a partir da mistura da fase aquosa (90%, p/p), constituída de 1% (p/p) de polissorbato 80 ou 0,9% em peso de polissorbato 80 + 0,1% de arginato láurico, dispersos em tampão citrato (5 mM, pH 3,5), e a fase lipídica (10%), composta por óleo de tomilho e óleo de milho, em um homogeneizador de alta velocidade, durante dois minutos, seguido por uma homogeneização em alta pressão, a 10 KPa, por cinco ciclos. Os resultados indicaram que a presença de arginato láurico aumentou a eficácia antimicrobiana da nanoemulsão, sendo necessária apenas a utilização de 30% do inibidor de amadurecimento (óleo de milho). Além disso, com a presença do tensoativo catiônico, foi necessária uma concentração de 200 g/mL de óleo de tomilho para inibir o crescimento da levedura de deterioração em alimentos, *Z. bailii*.

Em 2015, Salvia-Trujillo e colaboradores desenvolveram nanoemulsões microfluidizadas contendo os óleos essenciais de capim-limão, cravo, melaleuca, tomilho, gerânio, manjerona, palmarosa, pau-rosa, sálvia e hortelã e avaliaram sua atividade frente à *E. coli*, visando empregá-las como revestimentos antimicrobianos comestíveis em frutas processadas. As nanoemulsões foram preparadas a partir de emulsões grosseiras, com fase dispersante constituída de solução aquosa de alginato de sódio (1%, p/v), polissorbato 80 (1%, v/v) e fase lipídica dos óleos essenciais em estudo (1%, v/v). As fases foram misturadas em homogeneizador de alta velocidade, por dois minutos, a 3.400 rpm, seguidas por três ciclos, a 150 MPa, em microfluidizador. As nanoemulsões compostas pelos óleos de tomilho, capim-limão, cravo e palmarosa foram as que apresentaram maior atividade bactericida *in vitro* contra *E. coli*. Deste modo, os autores ressaltam os promissores resultados para a indústria alimentícia.

Xue, Davidson e Zhong (2015) desenvolveram nanoemulsões a partir da mistura de caseinato de sódio (4% e 2%, p/v), lecitina (0,5% e 0,25%, p/v) e óleo de tomilho (1%, p/v), objetivando avaliar a atividade antimicrobiana das formulações, compreender a influência da concentração dos agentes emulsionantes e verificar sua potencial aplicação como conservantes em alimentos. As nanoemulsões foram preparadas a partir da mistura de caseinato de sódio (hidratado, à temperatura de 21 °C) e lecitina, mantidas em vórtex durante

30 minutos. Após, o óleo de tomilho foi adicionado, e a mistura foi levada ao microprocessador, por três minutos, a 15.000 rpm. As formulações apresentaram atividade antimicrobiana similar quando testadas contra as bactérias *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella enteritidis* em caldo soja tripticaseína. Os autores sugerem que os sistemas nanoestruturados podem ser usados para incorporar o óleo de tomilho como antimicrobiano e, deste modo, utilizá-lo como conservante alimentício.

Em 2016, Guerra-Rosas e colaboradores estudaram a estabilidade de nanoemulsões contendo os óleos essenciais de tomilho, orégano, capim-limão ou tangerina estabilizadas por pectina com alto grau de metoxilação e polissorbato 80, durante 56 dias. Foram preparadas, primeiramente, emulsões grosseiras a partir da mistura de uma solução aquosa de pectina (1%, p/v), do óleo essencial (2%, v/v) e do polissorbato 80 (5%, p/v), para um volume final de 1000 mL, em homogeneizador de alta velocidade (dois minutos, a 9.500 rpm), seguido por cinco ciclos no microfluidizador (150 MPa). Os autores evidenciaram maior estabilidade no diâmetro médio das gotículas para as nanoemulsões de capim-limão e tangerina quando comparadas às nanoemulsões contendo o óleo de tomilho e orégano. Como conclusão do estudo, eles afirmam que os resultados obtidos são de grande importância para futuros estudos de nanoemulsões estáveis a longo prazo para serem usadas como sistemas de liberação em produtos alimentícios.

Outro estudo de desenvolvimento de nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho foi desenvolvido por Ozogul e colaboradores (2016). Neste trabalho, as propriedades antimicrobianas e antioxidante de nanoemulsões contendo os óleos de tomilho, alecrim, louro ou sálvia foram investigadas na qualidade da truta arco-íris. Filés de peixe foram imersos durante três minutos nas nanoemulsões contendo os diferentes óleos e durante 24 dias de armazenamento, diversas análises foram realizadas, incluindo análises sensoriais, químicas e microbiológicas. Quanto à preparação das nanoemulsões, a fase oleosa (10%), composta por 4% de óleo essencial, 3% de etanol e 3% de polissorbato 80, foi mantida em agitação por uma hora a 86 °C e, após, a água (90%) foi incorporada ao sistema. A mistura foi homogeneizada em misturador ultrassônico, durante 15 minutos a 72 de amplitude, o equipamento operou a 500 W de potência e frequência de 20 KHz. Em resposta às análises, foi verificado que as nanoemulsões aumentaram a qualidade organoléptica da truta arco-íris. Além disso, a vida de prateleira foi de 17 dias para os grupos tratados e 14 para os controles. Os grupos que foram submersos nas nanoemulsões apresentaram redução nos valores dos parâmetros bioquímicos e, as nanoemulsões contendo óleo de alecrim e tomilho, foram mais eficazes em retardar o

crescimento bacteriano. Assim, os pesquisadores concluem que os óleos de alecrim e tomilho incorporados em nanoemulsões podem atuar como conservantes de filés de peixe.

Guerra-Rosas e colaboradores (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo os óleos essenciais de orégano, tomilho, capim-limão ou mandarin contra *E. coli* e *Listeria innocua*. As nanoemulsões foram preparadas como descrito anteriormente (Guerra-Rosas et al., 2016). Segundo os testes realizados, a nanoemulsão contendo o óleo de capim-limão exibiu maior atividade. Também foi observado que, ao longo do tempo de armazenamento, houve uma diminuição gradual da atividade antimicrobiana das nanoemulsões, independente do óleo essencial utilizado, atribuída a perda dos compostos voláteis principais. O estudo evidenciou o potencial das nanoemulsões como sistemas de liberação antimicrobiana em bebidas e alimentos.

Artiga-Artigas e colaboradores (2018) estudaram a influência de diferentes óleos essenciais (orégano, tomilho, capim-limão e tangerina) sobre as propriedades de nanoemulsões, como tamanho das gotículas, potencial zeta, viscosidade e índice de brancura a partir de diagramas de fases pseudoternárias. A preparação das nanoemulsões foi realizada conforme descrito por Guerra-Rosas e colaboradores (2016). Este estudo elucidou o papel da pectina e sua interação com tensoativos de moléculas pequenas em sistemas complexos para a formação de nanoemulsões.

Ryu e colaboradores (2018) estudaram o impacto de inibidores de maturação na formação, estabilidade e atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho. Os inibidores de interesse neste estudo incluem o TCM, óleo de canola, milho, palma e coco. Por o TCM já ter sua atividade estabilizadora demonstrada em estudos anteriores, foi estudada sua ação em associação com os outros óleos. As nanoemulsões foram preparadas pela titulação da fase oleosa, constituída de óleo essencial de tomilho (40% em peso da fase oleosa), inibidor de amadurecimento (60% em peso da fase oleosa) e polissorbato 80, na fase aquosa, composta por tampão citrato de sódio 5 mM (pH 3,5), a uma taxa de 2 mL por minuto, e mantida em agitação durante 15 minutos. As nanoemulsões foram, então, filtradas (filtros 0,45 µm) e armazenadas à 4 e 20 °C durante 30 dias. A atividade antimicrobiana das nanoemulsões contra espécies de *Salmonella* dependeu da natureza do inibidor de maturação utilizado e sua concentração. As formulações mais promissoras foram as desenvolvidas com os óleos de palma e de milho, seguidas por canola e coco. A importância desses resultados implica no desenvolvimento de formulações para liberação de óleos essenciais com atividade antimicrobiana.

Hossain e colaboradores (2019) desenvolveram nanoemulsões contendo óleo de tomilho associado aos óleos de orégano, melaleuca ou hortelã-pimenta para incorporação em filmes à base de quitosana, objetivando o controle do crescimento de fungos durante o armazenamento de alimentos. Para obtenção das nanoemulsões, a fase oleosa (5%, p/v) foi composta pela mistura dos óleos, na proporção 1:1, de tomilho e orégano (formulação 1), tomilho e melaleuca (formulação 2) e tomilho e hortelã-pimenta (formulação 3), e a fase aquosa (1,25% de lecitina e 3,75% de polissorbato 80) foram misturadas em homogeneizador de alta velocidade (dois minutos, a 15.000 rpm) e após, submetidas ao microfluidizador (três ciclos a 15.000 psi). Após, os filmes foram preparados e apresentaram atividade antifúngica frente ao *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *Penicillium chrysogenum*, demonstrando uma liberação lenta dos componentes voláteis (26%) ao longo de 12 semanas de armazenamento.

Wan e colaboradores (2019) desenvolveram nanoemulsões contendo óleos essenciais, dentre eles, o óleo de cravo, tomilho, capim-limão, hortelã-pimenta e canela, a fim de avaliar a atividade antifúngica e a atividade contra micotoxinas, destinadas à indústria de alimentos. As nanoemulsões foram compostas por uma fase lipídica, constituída de óleo essencial (2,5%, p/p) e TCM (2,5%, p/p) e uma fase aquosa, formada por 94,5% de solução tampão fosfato (10 mM, pH 7,0) e polissorbato 80 (0,5%, p/p). As fases foram homogeneizadas em misturador de alta velocidade, por dois minutos e, então, transferidas para um microfluidizador, na qual quatro pressões foram testadas (5.000, 10.000, 15.000 e 20.000 psi) e três números de ciclos foram avaliados (1, 2 e 3 vezes). As formulações foram armazenadas à 4 e 25 °C durante 30 dias. A concentração total de óleo das nanoemulsões foi de 25 mg/g. A partir dos resultados, a preparação das nanoemulsões foi otimizada (pressão de 10.000 psi e 2 ciclos), verificando-se que o tipo e a concentração de óleo essencial tem influência na atividade antifúngica, sendo a nanoemulsão contendo o óleo de tomilho a formulação com maior eficácia antifúngica. Em relação à inibição da produção de micotoxinas, todas as nanoemulsões apresentaram atividade inibitória, independente do óleo.

3.3.2 Delineamento experimental para otimização de formulações

Com o objetivo de diminuir custos e tempo, técnicas de planejamento de experimentos têm sido utilizadas para otimizar produtos e processos em diversas áreas e com uma variedade de finalidades (BAKKE et al., 2008), pois são aplicadas como uma alternativa eficiente para identificar os fatores significativos e, deste modo, obter resultados com informações mais

precisas, necessitando de um número menor de experimentos (NARENDERAN, MEYYANATHAN, KARRI; 2019).

Nos estudos de pré-formulação, os delineamentos experimentais também são utilizados, uma vez que são técnicas de análise para quando se têm dois ou mais fatores que podem influenciar o resultado da variável resposta (MENDONÇA, 2012). Essas análises multivariadas também são conhecidas como MANOVA, do inglês *Multivariate Analysis of Variance*. São testes em que se procura verificar diferenças existentes entre n grupos ou tratamentos (PONTES, 2005). Dentre as técnicas multivariadas para otimização, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é uma metodologia que pode ser utilizada no estudo de interações entre uma ou mais variáveis dependentes com inúmeras variáveis independentes, a partir de um grupo de procedimentos matemáticos e estatísticos. Os resultados obtidos da relação das variáveis do planejamento fatorial podem ser analisados por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), tornando possível relacionar os fatores, as respostas e suas interações (CHAVES, 2008; MENDONÇA, 2012).

Com base nas informações obtidas pela análise multivariada, que muitas vezes geram um grande número de dados, são utilizadas outras técnicas matemáticas na qual seja possível interpretar e verificar os fatores responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, de modo que não haja perda significativa de informações, como, por exemplo, a Análise de Componentes Principais (ACP). Nessa análise, o conjunto original das variáveis é alterado, de modo equivalente, em grupos denominados Componentes Principais (CP). Essa técnica tem por objetivo substituir um conjunto de variáveis que estão correlacionadas por um grupo de novas variáveis não-correlacionadas e coloca-las em ordem decrescente de variáveis com importância de informação (VICINI, 2005).

Na literatura existem estudos que utilizaram o delineamento experimental na otimização de formulações nanoestruturadas. Em 2013, Pontes otimizou o processo de obtenção de nanoemulsões contendo óleo essencial de cravo a partir do DCCR baseado na MSR, na qual as variáveis independentes foram concentração do óleo de cravo (2 a 4%) e polissorbato 80 (1,5 a 2,5%), e a variável dependente o diâmetro médio das gotículas. Katsouli e colaboradores (2018) otimizaram a quantidade de água na composição de nanoemulsões contendo azeite extra virgem e compostos bioativos (ácido ascórbico e gálico) utilizando a MSR. As variáveis dependentes foram diâmetro médio das gotículas, índice de polidispersão e turbidez em resposta às variáveis independentes, razão dos agentes emulsionantes e razão dos compostos bioativos.

Tendo em vista o exposto e considerando que os estudos associando o óleo de tomilho à nanoemulsões relatados na literatura, estão, em sua grande maioria, voltados ao interesse da indústria alimentícia, este trabalho visou desenvolver nanoemulsões contendo, exclusivamente, o óleo essencial de tomilho, sem associação com substâncias antifúngicas sintéticas, a fim de explorar a sua potente atividade antimicrobiana com o propósito de contemplar a área farmacêutica, sendo uma possível alternativa no tratamento tópico de infecções fúngicas. Esta formulação pode servir como base para a obtenção de outras formas farmacêuticas, bem como ser associado a outros fármacos com potencialidades terapêuticas semelhantes. Além disso, a proposta de trabalho buscou empregar um método simples para a produção das nanoemulsões, sem o uso de equipamentos mais robustos e menor gasto de energia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O óleo essencial de tomilho (*T. vulgaris*), foi obtido da empresa Vimontti (lote 02, safra 2018, Santa Maria, Brasil). O padrão de timol (pureza: 98,5%), o monooleato de sorbitano (Span[®] 80) e polissorbato 80 (Tween[®] 80) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Os solventes, reagentes e meios de cultura utilizados neste trabalho apresentaram grau analítico/farmacêutico. A amostra comercial do óleo essencial de tomilho foi cadastrado para pesquisa no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) – número de cadastro A8EC3FE.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Identificação e avaliação da composição química do óleo essencial por GC-FID e GC/MS

Inicialmente, uma amostra da planta foi coletada e identificada por profissional qualificado (botânico) confirmando o gênero e a espécie do vegetal como *Thymus vulgaris* L. (Figura 10).

Figura 10 – Amostra da planta *Thymus vulgaris* L. coletada na empresa Vimontti



Fonte: (Próprio autor).

Após, foi realizada a caracterização e quantificação dos componentes presentes no óleo pelo Núcleo de Tecnologia em Alimentos (NTA) do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA). A análise quantitativa foi realizada em um cromatógrafo a gás Varian Star 3400CX (CA, EUA) equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID). Para tal, 5 μL de óleo foi diluído em 1 mL de hexano e uma alíquota de 1 μL da solução foi injetada na porta de injeção do cromatógrafo, a uma temperatura de 250 °C no modo *split* de razão 1:20. Os compostos foram separados numa coluna capilar apolar de sílica fundida BPX 5 (25 m \times 0,22 mm \times 0,25 μm) (SGE, Austrália). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste, a uma pressão constante de 10 psi. A temperatura inicial da coluna foi ajustada para 50 °C e mantida durante 0,5 minutos. Em seguida, um gradiente de temperatura foi iniciado subindo a 4 °C/min até 80 °C, depois até 260 °C (aumento de 10 °C/min) e mantida em condições isotérmicas durante 2 minutos. A temperatura do detector foi mantida a 280 °C. Uma série de n-alcenos homólogos foram analisados sob as mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção linear (IRL). A quantidade percentual relativa de cada composto foi obtida a partir da área do pico em relação a área total.

A análise qualitativa dos compostos foi efetuada por um cromatógrafo gasoso Shimadzu QP2010 Plus acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Para esta análise, foram usadas as mesmas condições cromatográficas descritas acima e hélio foi utilizado como o gás de arraste. O detector foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons com uma energia de ionização de 70 eV e um intervalo de varredura de massas 35-350 m/z. Os analitos foram identificados com base na comparação com os espectros de massas disponível na biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST, versão 05) e por comparação dos índices de retenção linear calculados com aqueles disponíveis na literatura científica.

4.2.2 Preparação das nanoemulsões contendo o óleo essencial de tomilho

Tendo como objetivo obter nanoemulsões óleo/água mais estáveis e com propriedades físico-químicas adequadas, foi utilizado neste estudo um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) utilizando um esquema fatorial 2^2 com quatro pontos centrais, e posteriormente analisado por Metodologia de Superfície de Resposta. Neste sentido, foi investigado o efeito das variáveis independentes, quantidade de Tween[®] 80 e Span[®] 80 em variáveis de resposta, como tamanho de gotículas e homogeneidade do sistema. Após preparação, as nanoemulsões foram analisadas quanto ao diâmetro médio de gotículas e índice

de polidispersão. O planejamento experimental contendo os níveis das variáveis independentes codificadas e os valores reais estão apresentados na Tabela 1. A escolha das faixas experimentais testadas baseou-se nos resultados obtidos a partir de testes preliminares.

Tabela 1 – Variáveis independentes e seus níveis correspondentes codificados e os valores reais

Experimento	Níveis codificados		Valores reais	
	Tween [®] 80	Span [®] 80	Tween [®] 80	Span [®] 80
1	-1	-1	0,45	0,13
2	-1	1	0,45	0,35
3	1	-1	0,67	0,13
4	1	1	0,67	0,35
5	$-\alpha^a$	0	0,40	0,24
6	α	0	0,72	0,24
7	0	$-\alpha$	0,56	0,08
8	0	α	0,56	0,40
9 ^b	0	0	0,56	0,24
10 ^b	0	0	0,56	0,24
11 ^b	0	0	0,56	0,24
12 ^b	0	0	0,56	0,24

^a $\alpha = 1,414$

^b Replicatas do ponto central

Propondo não utilizar aquecimento para a obtenção das formulações devido as propriedades voláteis dos óleos essenciais, as nanoemulsões contendo o óleo de tomilho foram preparadas em triplicata pelo método de homogeneização sob alta velocidade utilizando um equipamento UltraTurrax[®] (IKA, Alemanha) de acordo com a técnica descrita por Otoni e colaboradores (2014) com algumas modificações. A fase oleosa foi composta pelo óleo essencial de tomilho (2%) e monooleato de sorbitano (Span[®] 80) e a fase aquosa constituída de polissorbato 80 (Tween[®] 80) e água ultrapura. A fase aquosa foi solubilizada separadamente com auxílio de um agitador magnético a 440 rpm por, aproximadamente, 20 minutos. Após, a mesma foi vertida na fase oleosa e levada ao agitador de alta velocidade por 4 minutos, a 16.000 rpm para diminuição do tamanho das gotículas. Esses parâmetros foram

definidos após testes preliminares. As formulações com as melhores condições obtidas a partir do delineamento experimental, foram armazenadas em recipientes de vidro transparente, protegidas da luz, nas temperaturas de 5 e 25 °C (n=3 para cada temperatura) para posteriores comparações e estudo de estabilidade.

4.2.3 Caracterização físico-química das nanoemulsões

4.2.3.1 Determinação do tamanho médio das gotículas e do índice de polidispersão (PDI)

O diâmetro médio das gotículas e o PDI foram determinados pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer[®] Nano ZS, Malvern Instruments, UK) após diluição de uma alíquota das amostras em água previamente filtrada, na proporção de 1:500 (v/v).

4.2.3.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética (Zetasizer[®] Nano ZS, Malvern Instruments, UK) após diluição das suspensões em solução de NaCl 10 mM (1:500, v/v).

4.2.3.3 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

O pH foi verificado diretamente nas dispersões por meio de um potenciômetro (Seven Easy, Metler Toledo, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

4.2.3.4 Determinação do teor de timol nas nanoemulsões

O teor de timol foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com metodologia validada por Nunes e colaboradores (2005) com algumas modificações. O método foi co-validado considerando os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção (APÊNDICE A), utilizando como fase móvel acetonitrila e água ultrapura, na proporção de 55:45 (v/v), respectivamente, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e a detecção do timol foi realizada em 276 nm. Para a extração do timol das nanoemulsões, uma alíquota das amostras

foi diluída em acetonitrila e extraídas a partir de 30 inverões manuais do balão volumétrico a fim de se obter uma concentração final de 20 µg/mL de timol, após, as amostras foram filtradas em filtro quantitativo (0,45 µm) e injetadas no CLAE. A preparação do padrão foi realizada a partir da solubilização de 0,01g de timol em acetonitrila e posterior diluição para concentração final de 20 µg/mL.

4.2.4 Estudo de Estabilidade

4.2.4.1 Estudo de estabilidade das nanoemulsões

Com o propósito de avaliar a estabilidade das formulações otimizadas, os parâmetros físico-químicos (tamanho de gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e teor de timol) foram monitoradas logo após a preparação das amostras e nos tempos 7, 16, 30, 60 e 100 dias, para ambas temperaturas de armazenamento (5 e 25°C).

4.2.4.2 Estudo de estabilidade das nanoemulsões por cromatografia gasosa utilizando a técnica de microextração em fase sólida (HS-SPME)

Objetivando avaliar o comportamento dos componentes do óleo essencial de tomilho frente a diferentes temperaturas e, conseqüentemente, a estabilidade das formulações, nanoemulsões foram preparadas e suas propriedades físico-químicas iniciais (tamanho de gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH) foram analisadas, bem como a extração dos compostos voláteis por HS-SPME. Posteriormente, as formulações foram divididas em frascos âmbar de 5 mL e armazenadas às temperaturas de 5 °C, 20 °C e 40 °C (n=3 para cada temperatura). As análises foram realizadas nos tempos de 1,5; 7; 15 e 30 dias.

4.2.4.2.1 Preparação das amostras e processo de extração

A determinação da estabilidade das nanoemulsões foi realizada pela comparação dos terpenos livres avaliado no *headspace* das formulações em comparação com o óleo livre (na mesma concentração) pela técnica de microextração em fase sólida (HS-SPME). Assim, foi utilizado, um dispositivo manual de SPME equipado com uma fibra Carboxen – PDMS (75 µm; Supelco, Bellefonte, PA, USA). Para extração da amostra, 1 mL de cada formulação foi

condicionada em um frasco de vidro de 20 mL, fechado hermeticamente com um septo de PTFE. As amostras foram submetidas a um tempo de equilíbrio de 5 minutos na mesma temperatura usada para a extração (30 °C). Após o tempo de equilíbrio, a extração foi realizada pela exposição da fibra no *headspace* da amostra durante 15 minutos sob agitação e em seguida foi dessorvida por 10 minutos no sistema cromatográfico.

4.2.4.2.2 Condições cromatográficas

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás Varian Star 3400CX (CA, EUA), equipado com detector de ionização de chama (GC-FID). A fibra de SPME foi dessorvida na porta de injeção do cromatógrafo a uma temperatura de 250 °C no modo *split* de razão 1:50. Os compostos foram separados numa coluna capilar apolar de sílica fundida EquityTM – 5 (60 m × 0,20 mm × 0,20 µm) (Supelco, Bellefonte, PA). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste, a uma pressão constante de 25 psi. A temperatura inicial da coluna foi ajustada para 50 °C e mantida durante 0,5 minutos. Em seguida, um aumento de temperatura foi iniciado subindo a 4 °C/min até 80 °C, depois até 260 °C, por um aumento a 10 °C/min e mantida em condições isotérmicas durante 2 minutos. A temperatura do detector foi mantida a 280 °C. Uma série de n-alcenos homólogos foi analisada sob as mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção linear (IRL). A quantificação dos terpenos associado as nanoemulsões foi realizada pela comparação relativa da área de cada composto volátil no *headspace* com as áreas obtidas no *headspace* pelo óleo livre.

4.2.5 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

A avaliação da atividade antifúngica das nanoemulsões contendo o óleo essencial de tomilho foi realizada segundo Flores e colaboradores (2017) com algumas modificações, na qual o método empregado foi difusão em ágar com poços frente à levedura de *C. albicans* (ATCC 10231), esta foi mantida em ágar Sabouraud-dextrose 4% (SAD), por 48 horas, a temperatura de 25 ± 2 °C (tubo inclinado). Para a preparação do inóculo 1% (v/v), o microrganismo foi diluído com solução salina estéril até a concentração de 25 ± 2% de transmitância, lida em espectrofotômetro (Pró-Análise, modelo UV-1800 PC, Porto Alegre, Brasil), a 580 nm.

Para a realização do ensaio, primeiramente, 20 mL do meio Sabouraud-dextrose 4% foram dispostos em placas de Petri estéreis (camada base). Após a solidificação total do meio,

5 mL do inóculo foram uniformemente distribuídos sob a camada base. Após, orifícios de 9,5 mm de diâmetro foram feitos com o auxílio de um cilindro de metal e, em seguida, preenchidos com 100 µL das amostras (nanoemulsões armazenadas a 5, 20 e 40 °C), solução de timol, amostra contendo a mistura dos componentes presentes nas nanoemulsões (exceção do óleo) para descartar possíveis interferências dos excipientes e o solvente utilizado para diluir o timol (metanol). A concentração de timol, em cada orifício que continha as nanoemulsões e a solução de timol, foi de 480 µg/mL. As placas foram incubadas a 35 ± 5 °C, por 24 horas, e no término deste período, o diâmetro dos halos de inibição foram medidos com o auxílio de paquímetro digital (Paquímetro Eletrônico Digital Starrett, 727). O teste foi realizado em sextuplicata para cada amostra.

4.2.6 Estudo de liberação *in vitro* de timol das nanoemulsões

O perfil de liberação do timol a partir das nanoemulsões (n=3) foi avaliado pela técnica de difusão em sacos de diálise (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA). O meio de liberação utilizado foi água:etanol (70:30, v/v) respeitando a condição *sink* (condição de não saturação do meio). Para a realização do experimento, 1 mL de cada formulação teste foi colocada em sacos de diálise com, aproximadamente, 8 cm de comprimento, os quais foram imersos em 150 mL de meio de liberação, a uma temperatura de 35 °C, sob agitação constante, por um período de 30 horas. Para fins de comparação, uma solução metanólica contendo o óleo essencial de tomilho não associado (livre), na mesma concentração das nanoemulsões (20 mg/mL), foi também avaliada nas mesmas condições. Em tempos pré-determinados (0,25; 0,50; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 24 e 30 horas), alíquotas do meio receptor foram coletadas e avaliadas por CLAE a partir de uma metodologia previamente validada. A cada coleta, a mesma quantidade de meio fresco foi imediatamente repostada. A quantidade liberada de timol para cada amostra e em cada tempo foi determinada.

4.2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo software estatístico GraphPad PRISM[®] 6 (San Diego, CA, EUA) e a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de normalidade omnibus de D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. O teste *t* de Student não pareado foi utilizado para investigar a possível diferença entre as nanoemulsões na

caracterização das formulações. Dados não paramétricos (referentes a estabilidade das formulações) foram expressos como mediana \pm intervalo interquartil. Além disso, todos os dados foram autoescalados e submetidos à análise multivariada de componentes principais (PCA) utilizando o software Pirouette 3.11 (Woodinville, EUA, 2003). A comparação das formulações no teste de liberação *in vitro* foram analisadas por análise de variância de duas vias (ANOVA) e expressos como média \pm desvio padrão da média. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,01$ para o teste de liberação *in vitro* e $p < 0,05$ para os demais testes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO POR GC-FID E GC/MS

A análise cromatográfica possibilitou determinar a composição do óleo essencial de tomilho utilizado no presente estudo. Foram identificados 95,21% dos constituintes do óleo essencial, sendo os constituintes majoritários o para-cimeno (42,21%), timol (24,40%) e gama-terpineno (8,37%), seguido de diversos outros terpenos, em baixas concentrações (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Compostos	TR ^a	IRL calc. ^b	IRL lit. ^c	Área (%)
α -thujene	2,865	911	911	1,37
α -pineno	2,992	922	917	1,02
Canfeno	3,304	944	936	0,53
Octenol	4,090	978	979	1,06
β -mirceno	4,131	994	987	2,13
4-careno	4,765	1014	1014	1,25
p-cimeno	5,064	1037	1027	42,21
Limoneno	5,138	1041	1028	0,17
Eucaliptol	5,214	1043	1035	1,14
γ -terpineno	5,872	1067	1062	8,37
Hidrato de cis-sabineno	6,325	1075	1074	1,09
Linalol	7,207	1100	1104	2,93
Cânfora	8,620	1158	1156	0,43
Éter metil timol	10,495	1237	1235	0,72
Éter metil isotimol	10,663	1247	1244	0,80
Timol	11,877	1290	1306	24,40
Carvacrol	11,977	1306	1317	1,68
Cariofileno	13,596	1450	1423	2,21

^a Tempo de retenção (minutos)

^b Índice de Retenção Linear calculado

^c Índice de Retenção Linear literatura (National Institute of Standards And Technology – NIST)

A quantidade dos constituintes presentes nos óleos essenciais desta espécie podem sofrer alterações, pois a idade da planta, ciclo vegetativo, época de coleta, condições climáticas e o solo podem interferir na concentração destes componentes no vegetal (LIMA et al., 2010; ROMERO et al., 2012; RAI et al., 2017).

Outros estudos avaliaram a composição do óleo de tomilho. Em 2014, Santurio e colaboradores adquiriram comercialmente o óleo de tomilho e após análise cromatográfica foram identificados 73% dos componentes, apresentando como compostos majoritários o p-cimeno (23,71%), timol (13,86), γ -terpineno (8,55%) e linalol (6,5%). Miranda e colaboradores (2015) coletaram a planta no município de Lavras (Minas Gerais) e após extração do óleo de tomilho por hidrodestilação identificaram 96,05% dos constituintes, sendo os majoritários o timol (50,51%), o p-cimeno (15,08%) e o γ -terpineno (4,07%). Gonçalves (2016) obteve comercialmente o óleo, o mesmo apresentou o timol (53,57%), p-cimeno (15,51%), limoneno (7,14%) e carvacrol (6,93%) como componentes majoritários, totalizando 83% da sua composição. Lima (2017) adquiriu comercialmente o óleo essencial de tomilho e identificou 99,4% dos constituintes, sendo o timol (45,60%), p-cimeno (37,20%) e linalol (4,7%) os compostos majoritários. De posse dos resultados obtidos, o óleo essencial de tomilho utilizado neste estudo apresenta-se de acordo com os parâmetros encontrados na literatura.

5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As concentrações de Tween[®] 80 e Span[®] 80 utilizadas na obtenção das nanoemulsões contendo 2% de óleo de tomilho (equivalente a 4,8 mg/mL de timol) foram otimizadas para se obter formulações com propriedades adequadas. Dessa forma, o tamanho das gotículas e o índice de polidispersão foram as variáveis dependentes testadas por meio do delineamento experimental descrito anteriormente e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores obtidos para as variáveis dependentes (tamanho de gotículas e índice de polidispersão)

Experimento	Valores reais		Variáveis de resposta	
	Tween [®] 80	Span [®] 80	Tamanho gotícula (nm)	PDI
1	0,45	0,13	144	0,29
2	0,45	0,35	174	0,26
3	0,67	0,13	101	0,35
4	0,67	0,35	103	0,26
5	0,40	0,24	164	0,28
6	0,72	0,24	80	0,30
7	0,56	0,08	123	0,28
8	0,56	0,40	123	0,27
9 ^a	0,56	0,24	128	0,25
10 ^a	0,56	0,24	120	0,28
11 ^a	0,56	0,24	129	0,24
12 ^a	0,56	0,24	129	0,26

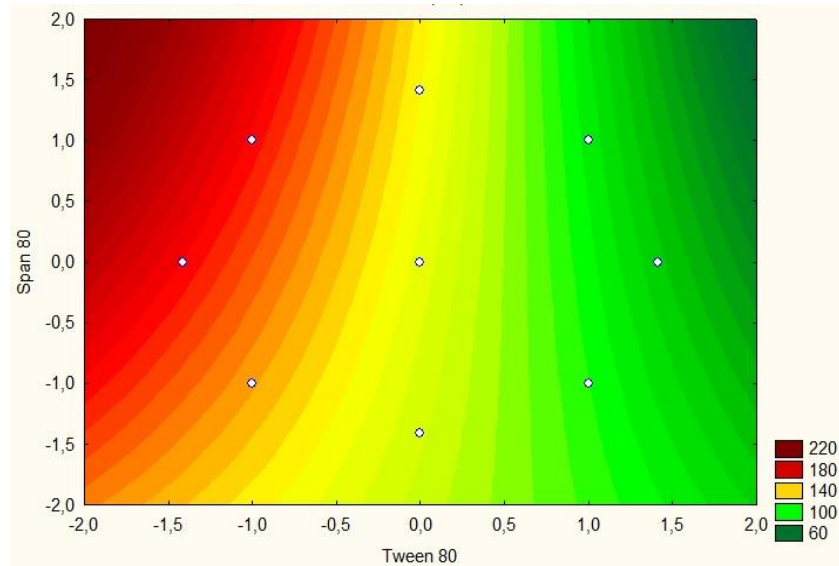
^a Replicatas do ponto central

Os resultados mostram uma interação entre as duas variáveis independentes (Tween[®] 80 e Span[®] 80) e seus efeitos sobre as variáveis dependentes estudadas (tamanho de gotículas e o índice de polidispersão), demonstrada na Figura 11 (a) e (b), referente aos gráficos de superfície de resposta.

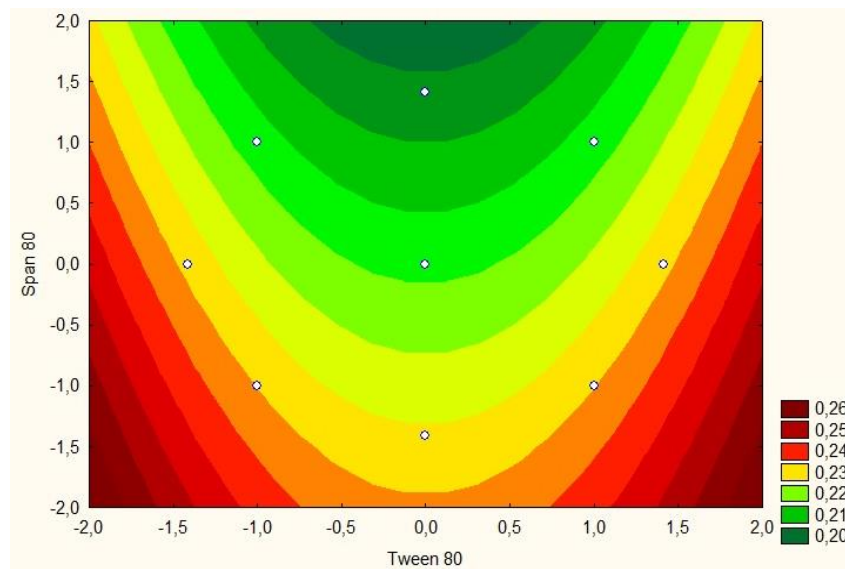
A Figura 11 (a) reporta a relação entre as concentrações dos tensoativos na qual é possível trabalhar para obter formulações com tamanho de gotículas entre 80 a 180 nm. Considerando que todos os valores dentro dessa faixa são aceitáveis para as nanoemulsões, outro parâmetro importante foi avaliar quais as concentrações de tensoativos proporcionavam homogeneidade, neste parâmetro, ao sistema. A Figura 11 (b) demonstra a relação de tensoativos em resposta ao índice de polidispersão, exibindo as quantidades necessárias de tensoativos para manter o sistema com tamanho de gotas uniformes. Os índices de polidispersão expressos nessa figura encontram-se na faixa de 0,20 a 0,26, tendo em vista que valores abaixo de 0,30 são considerados sistemas homogêneos (DIVSALAR et al., 2012).

Figura 11 – Gráfico de superfície de resposta mostrando os efeitos da relação de Tween[®] 80 e Span[®] 80 no tamanho das gotículas (a) e no índice de polidispersão (b) de nanoemulsões O/A

(a)



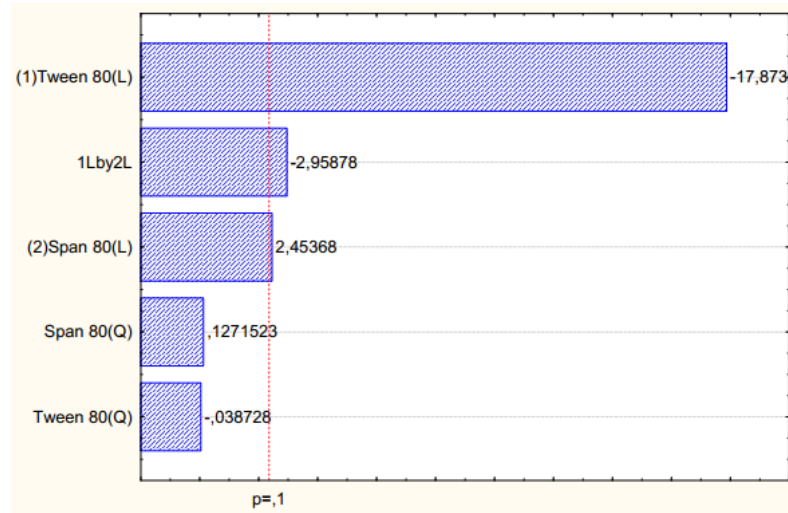
(b)



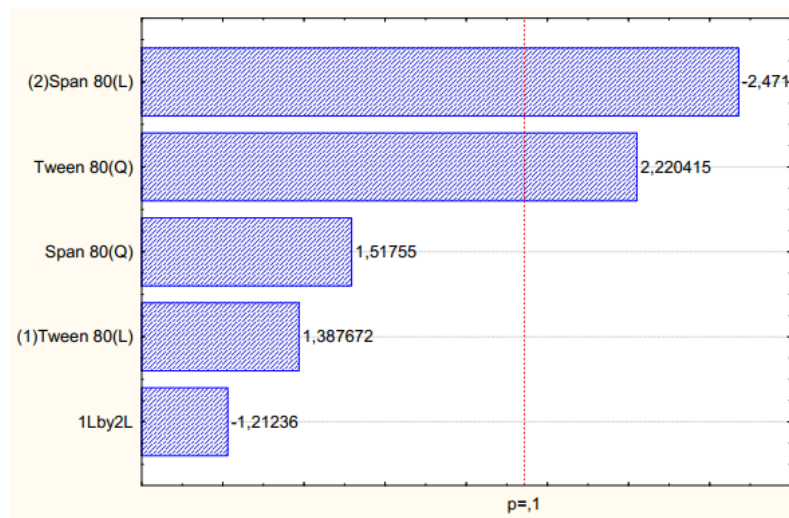
Uma melhor análise é realizada a partir dos diagramas de Pareto [Figura 12 (a) e (b)]. Na Figura 12 (a) é possível verificar que os três fatores estatisticamente significativos ($p < 0,1$) para o diâmetro médio das gotículas foram a concentração de Tween 80[®] (Linear), a mistura dos dois tensoativos (Tween 80[®] e Span 80[®]) e a concentração de Span 80[®] (Linear), sendo o primeiro fator o mais representativo. Na Figura 12 (b) pode-se observar que a concentração de Span 80[®] (Linear) e Tween 80[®] (Quadrática) apresentam influência estatisticamente significativa ($p < 0,1$) para o índice de polidispersão.

Figura 12 – Diagrama de Pareto com os efeitos estimados do (a) diâmetro médio das gotículas e (b) índice de polidispersão

(a)



(b)



A partir destas constatações foi possível estabelecer uma condição ideal, ou seja, qual a quantidade de cada agente emulsionante é necessária para estabilizar 2% de óleo presente nas formulações. À vista disso, foram escolhidas duas formulações para prosseguir com os estudos. A nanoemulsão referente à projeção otimizada da Condição Ideal obtida pelo desing experimental, nomeada de NE-OT-CI, na qual foram utilizados 0,56 g e 0,63 g de Tween[®] 80 e Span[®] 80, respectivamente, e a nanoemulsão NE-OT-PC, concernente ao Ponto Central do desing experimental, contendo 0,56 g de Tween[®] 80 e 0,24 g de Span[®] 80.

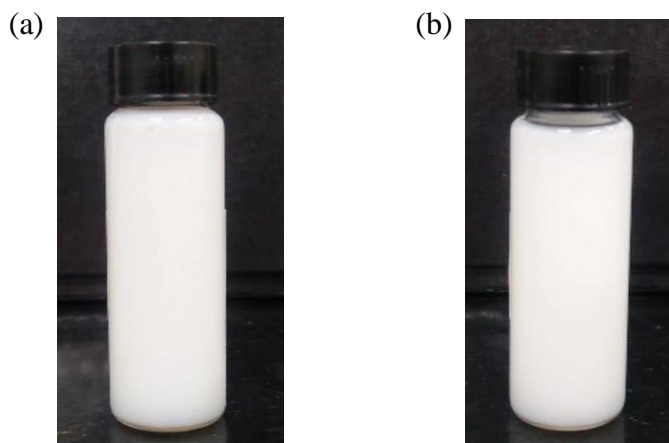
Existem estudos na literatura onde esta ferramenta também foi utilizada para otimização de formulações. Mehmood e colaboradores (2017) empregaram a metodologia de

superfície de resposta para desenvolver nanoemulsões contendo óleo de oliva e alfa-tocoferol, sendo o tempo de homogeneização, a quantidade de óleo de oliva e a concentração de tensoativo as variáveis independentes, e os valores de máxima atividade antioxidante, menor tamanho de gotículas e menor valor de para-anisidina (utilizado para testar a presença de produtos de oxidação em gorduras e óleos) as variáveis dependentes. Os resultados obtidos visam estudos futuros de liberação de substâncias a partir de sistemas coloidais de grau alimentício para componentes funcionais. Raviadaran e colaboradores (2018) também utilizaram esta técnica para produzir e otimizar nanoemulsões à base de óleo de dendê contendo curcumina, com o objetivo de aumentar a disponibilidade da curcumina e, assim, explorar suas atividades anti-inflamatória e anticancerígena. As variáveis independentes testadas foram a pressão do microfluidizador, número de ciclos e concentração de tensoativo em variáveis de resposta como tamanho da gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e viscosidade.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC apresentaram, macroscopicamente, aspecto homogêneo (Figura 13), com reflexo azulado resultante do movimento browniano das gotículas de óleo (efeito *Tyndall*) e odor característico do óleo essencial de tomilho, porém, mais suave quando comparado ao óleo puro. Os resultados referentes à caracterização das nanoemulsões se encontram na Tabela 4.

Figura 13 – Aspecto macroscópico das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b)



Fonte: (Próprio autor).

Tabela 4 – Caracterização físico-química das nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho a 2% (NE-OT-CI e NE-OT-PC)

Formulação	Tamanho (nm)	PDI ^a	PZ ^b (mV)	pH	Teor de Timol (mg/mL)
NE-OT-CI	138 ± 3	0,21 ± 0,02	-8,5 ± 0,4	5,24 ± 0,03	4,80 ± 0,11
NE-OT-PC	122 ± 3	0,26 ± 0,01	-8,3 ± 0,4	5,19 ± 0,03	4,85 ± 0,08

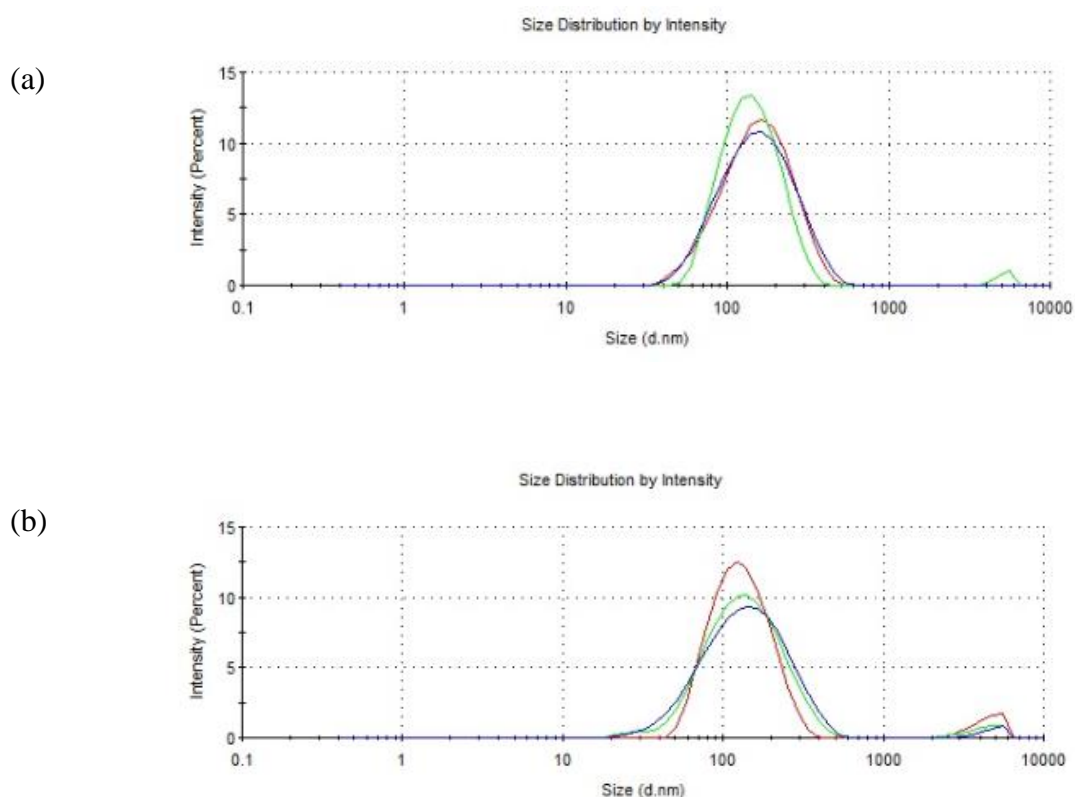
Fonte: Próprio autor.

^a Índice de Polidispersão

^b Potencial Zeta

A partir dos resultados, verificou-se que as nanoemulsões apresentaram tamanho de gotículas na faixa manométrica, inferior a <150 nm [Figura 14 (a) e (b)] e a metodologia utilizada para a preparação das formulações foi capaz de promover índices de polidispersão inferiores a 0,30, considerando que este é o valor encontrado na literatura para indicar a homogeneidade do sistema (DIVSALAR et al., 2012). Outros estudos realizados com diferentes óleos essenciais corroboram com os resultados encontrados. Giongo e colaboradores (2016) desenvolveram nanoemulsões contendo óleo essencial de gerânio (*Pelargonium graveolens*) a partir da metodologia de homogeneização sob alta velocidade utilizando equipamento Ultra Turrax[®]. As formulações apresentaram tamanho inferior a 200 nm e índice de polidispersão inferior a 0,30. Gündel e colaboradores (2018a) desenvolveram nanoemulsões contendo óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) por uma metodologia de homogeneização sob alta velocidade, sem o emprego de solventes, e a formulação apresentou tamanho nanométrico (<100 nm) e índice de polidispersão de 0,25.

Figura 14 – Distribuição do tamanho de gotículas das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b) pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons

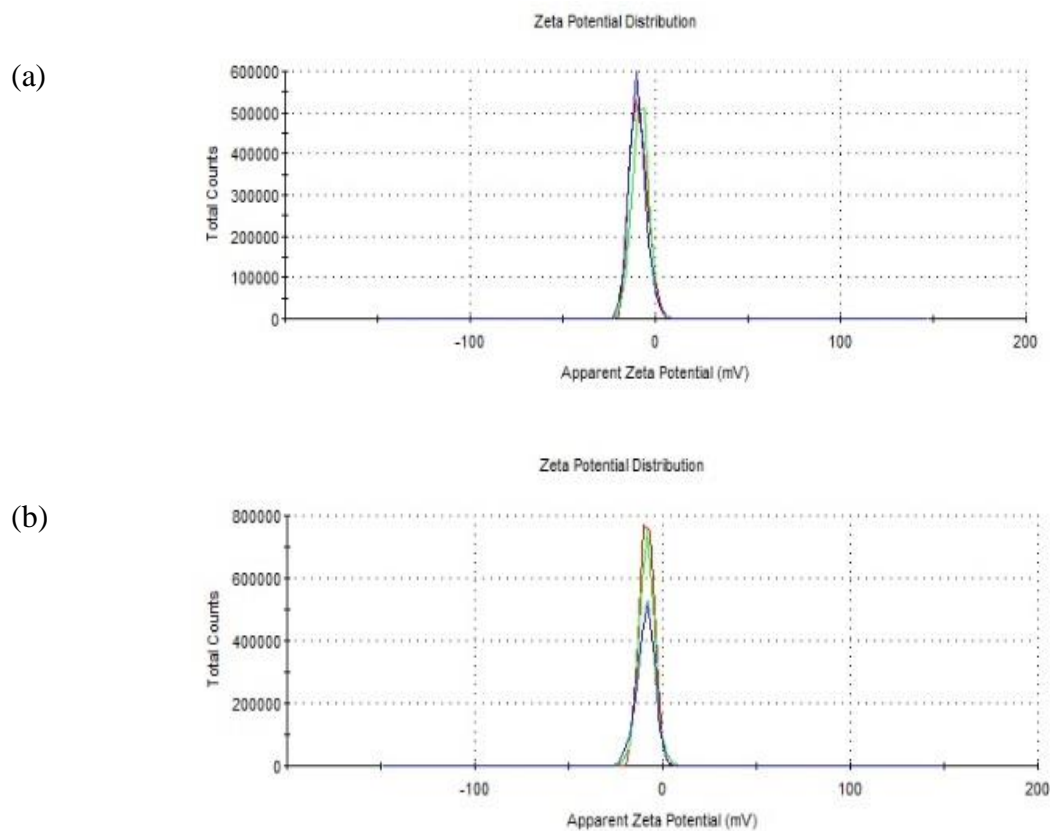


A carga superficial das nanoemulsões também foi avaliada e valores negativos de potenciais zeta foram observados (-8,3 e -8,5 mV) (Figura 15). A carga negativa é decorrente do polissorbato 80, pois este apresenta átomos de oxigênio nas moléculas responsável pela densidade de superfície negativa desse tensoativo não iônico (MARCHIORI et al, 2010). Valores de potenciais zeta diferentes de zero possuem menor probabilidade de causarem instabilidade no sistema, evitando fenômenos de floculação, cremação e coalescência (PEREIRA, 2011). Outro parâmetro analisado foi o potencial hidrogeniônico (pH) e ambas nanoemulsões apresentaram pH ácido, em torno de 5,2. Estes valores estão relacionados às características dos componentes presentes nas nanoemulsões, inclusive pela presença do óleo essencial de tomilho, pois normalmente os óleos essenciais apresentam valores ácidos de pH (GÜNDEL et al., 2018b).

Para a determinação da concentração de timol presente nas nanoemulsões em estudo, foi realizada uma co-validação da metodologia analítica (APÊNDICE A). O timol foi o marcador químico utilizado neste trabalho, tendo em vista a sua concentração presente no óleo de tomilho e importância para a atividade antimicrobiana do mesmo. Inicialmente,

determinou-se a concentração de timol na amostra comercial do óleo, comparado com o valor obtido na análise por cromatografia gasosa. Os resultados foram semelhantes (24% e 22%, determinados por GC e CLAE, respectivamente), evidenciando a aplicabilidade do método por cromatografia líquida empregado neste trabalho na determinação do teor de timol nas amostras em estudo. Em relação às nanoemulsões, o teor de timol foi próximo ao teórico (4,80 mg/mL), 4,81 mg/mL \pm 0,11 e 4,85 mg/mL \pm 0,08 para as nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, respectivamente. A análise estatística foi realizada e diferenças significativas não foram observadas entre as formulações em nenhum parâmetro avaliado.

Figura 15 – Distribuição do potencial zeta das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b) determinado por mobilidade eletroforética



5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE

5.4.1 Estudo de estabilidade das nanoemulsões

As nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, nas temperaturas de 5 e 25 °C, foram avaliadas logo após a preparação e nos tempos 7, 16, 30, 60 e 100 dias em relação ao diâmetro

médio das gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e teor de timol. As formulações foram armazenadas ao abrigo da luz e os sistemas nanoestruturados mantiveram suas características macroscópicas iniciais.

O diâmetro médio das gotículas (Figura 16) foi avaliado para ambas as formulações, NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b), nas temperaturas de 5 e 25 °C. A análise estatística foi realizada comparando os valores do decorrer do estudo com os valores obtidos após a preparação das formulações. Foi possível verificar que as nanoemulsões apresentaram pequenas oscilações de diâmetro, mas diferença estatística ($p < 0,05$) foi encontrada somente para a NE-OT-PC quando armazenada a 25 °C, por 16 dias. Apesar da diferença estatística, os valores continuam dentro dos aceitáveis, demonstrando a estabilidade das nanoemulsões neste parâmetro até os 100 dias de armazenamento. A homogeneidade do sistema também foi avaliada (Figura 17). O índice de polidispersão apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) para a formulação NE-OT-PC (25 °C) aos 60 dias. Este parâmetro demonstra a falta de homogeneidade do sistema para essa formulação, visto que o PDI atingiu um valor próximo a 0,4, quando o aceitável é no máximo 0,3 (DIVSALAR et al., 2012). Godoi e colaboradores (2017) realizaram um estudo de estabilidade com nanoemulsões contendo óleo de *Eucalyptus globulus* preparadas pelo método de emulsificação sob alta velocidade sem o emprego de solventes, pelo período de 90 dias, nas temperaturas de 4 e 25 °C. As nanoestruturas armazenadas a baixas temperaturas mantiveram o tamanho médio das gotículas (76 nm), apresentando PDI de 0,22 e 0,07 após a preparação e em 90 dias de armazenamento, respectivamente. Por outro lado, quando armazenadas a temperatura de 25 °C, um aumento no tamanho das gotículas foi verificado após 90 dias (152 nm) e o valor do PDI foi de 0,24.

Figura 16 – Diâmetro médio das gotículas das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b), armazenadas nas temperaturas de 5 e 25 °C, por um período de 100 dias. Os dados foram expressos em mediana \pm intervalo interquartil e analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$)

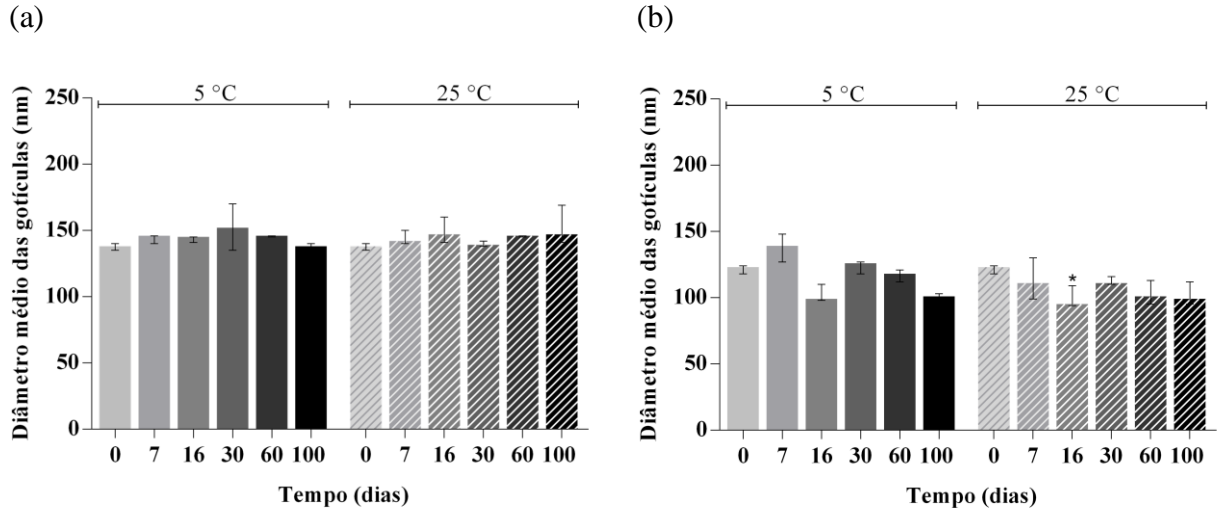
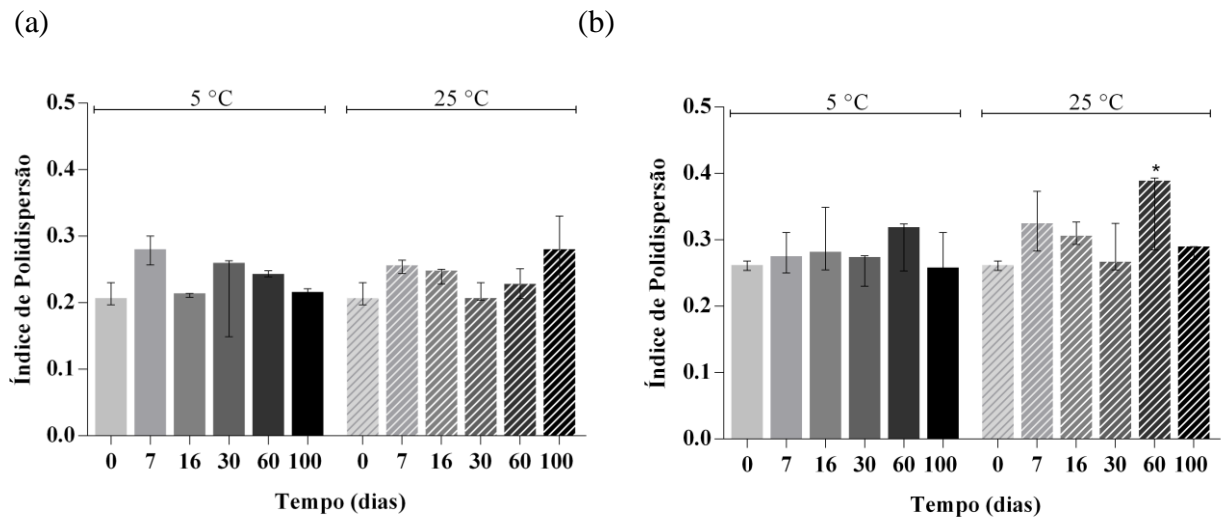


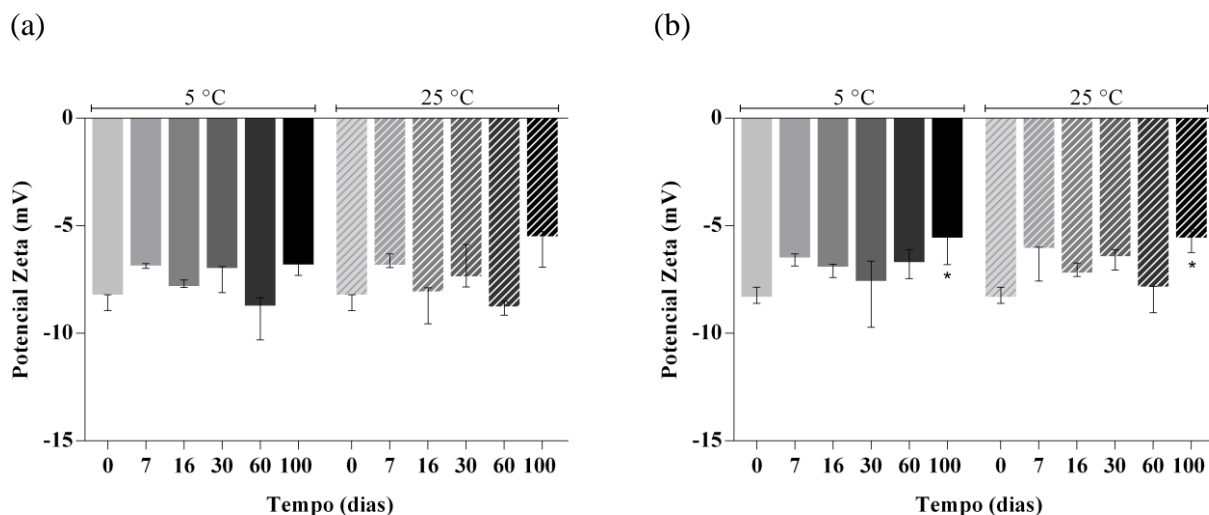
Figura 17 – Índice de polidispersão das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b), armazenadas nas temperaturas de 5 e 25 °C, por um período de 100 dias. Os dados foram expressos em mediana \pm intervalo interquartil e analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$)



O potencial zeta das formulações, também, foi analisado nos tempos pré-determinados do estudo da estabilidade. Este parâmetro reflete a força de repulsão entre as gotículas das nanoemulsões, sugerindo que a força de repulsão entre as gotículas são suficientes para impedir fenômenos de instabilidade (PIRES; MOURA, 2017). Após a preparação, o potencial zeta foi de -8,5 e -8,3 mV para as nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, respectivamente (Figura 18). No centésimo dia foi verificada diferença estatística ($p < 0,05$) para a formulação

NE-OT-PC, tanto na temperatura de armazenamento de 5 e 25 °C, quando os valores foram de $-5,8 \pm 0,8$ e $-5,7 \pm 0,6$, respectivamente.

Figura 18 – Potencial zeta das nanoemulsões NE-OT-CI (a) e NE-OT-PC (b), armazenadas nas temperaturas de 5 e 25 °C, por um período de 100 dias. Os dados foram expressos em mediana \pm intervalo interquartil e analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$)



O pH foi outra característica avaliada, uma vez que grandes modificações neste parâmetro podem indicar a ocorrência de reações químicas e influenciar o produto final (BERNARDI, 2011; SOUZA, 2013). Na Tabela 5, é possível observar valores de pH levemente ácido para ambas formulações, tanto as armazenadas em refrigeração quanto a temperatura ambiente. Apesar das nanoemulsões mantidas a baixas temperaturas apresentarem diferença estatística, os valores mantiveram-se bastante próximos, não ocasionando diferença nas características da formulação. As formulações armazenadas a temperatura ambiente, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) e os valores alcançaram aproximadamente 6,0. No que se refere ao teor de timol total presente nas nanoemulsões (Tabela 6), apesar de ser verificada diferença estatística ($p < 0,05$) para a formulação NE-OT-CI (5 °C) aos 100 dias, esta manteve-se dentro da faixa de 90 – 110%.

Tabela 5 – Potencial hidrogeniônico das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas nas temperaturas de 5 e 25 °C, por um período de 100 dias. Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$)

Tempo (dias)	5 °C		25 °C	
	NE-OT-CI	NE-OT-PC	NE-OT-CI	NE-OT-PC
0	5,24 ± 0,03 ^a	5,19 ± 0,03 ^a	5,24 ± 0,03 ^a	5,19 ± 0,03 ^a
7	5,55 ± 0,03 ^a	5,54 ± 0,06 ^a	6,10 ± 0,05 ^b	6,20 ± 0,05 ^b
16	5,70 ± 0,03 ^b	5,75 ± 0,05 ^b	6,20 ± 0,02 ^b	6,28 ± 0,21 ^b
30	5,65 ± 0,02 ^b	5,68 ± 0,03 ^a	6,02 ± 0,02 ^a	6,10 ± 0,20 ^a
60	5,51 ± 0,03 ^a	5,56 ± 0,09 ^a	5,87 ± 0,03 ^a	5,83 ± 0,08 ^a
100	5,51 ± 0,10 ^a	5,67 ± 0,11 ^a	5,79 ± 0,10 ^a	5,82 ± 0,09 ^a

*Letras diferentes na mesma coluna representam valores estatisticamente diferentes.

Tabela 6 – Teor das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas nas temperaturas de 5 e 25 °C, por um período de 100 dias. Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$)

Tempo (dias)	5 °C		25 °C	
	NE-OT-CI	NE-OT-PC	NE-OT-CI	NE-OT-PC
0	100,1 ± 2,2 ^a	101,6 ± 1,6 ^a	100,1 ± 2,2 ^a	101,6 ± 1,6 ^a
7	99,1 ± 1,3 ^a	97,5 ± 2,6 ^a	97,2 ± 2,6 ^a	98,3 ± 0,2 ^a
16	96,8 ± 0,7 ^a	100,1 ± 1,5 ^a	98,9 ± 1,5 ^a	100,4 ± 1,3 ^a
30	98,2 ± 1,2 ^a	99,7 ± 0,8 ^a	96,3 ± 1,0 ^a	98,7 ± 1,4 ^a
60	94,5 ± 0,1 ^b	97,8 ± 1,7 ^a	95,8 ± 2,9 ^a	98,2 ± 2,5 ^a
100	95,6 ± 1,5 ^b	99,3 ± 0,9 ^a	97,5 ± 1,0 ^a	100,7 ± 1,6 ^a

*Letras diferentes na mesma coluna representam valores estatisticamente diferentes.

5.4.2 Estudo de estabilidade das nanoemulsões por cromatografia gasosa utilizando a técnica de microextração em fase sólida (HS-SPME)

A microextração em fase sólida é uma técnica bastante utilizada por ser muito versátil, aplicada a diferentes tipos de analitos, por não necessitar da utilização de solventes e, também, permitir a extração e pré-concentração de analitos da matriz diretamente no

headspace da amostra de maneira simultânea (ZAMBONIN et al., 2004). Nesse sentido, essa técnica de extração foi empregada para avaliar a abundância dos componentes do óleo essencial de tomilho no *headspace* das formulações comparando com o óleo livre na mesma concentração, desta forma gerando uma resposta de estabilidade das nanoemulsões ao longo do tempo. Além disso, também foi realizada a análise do diâmetro médio de gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanoemulsões, a fim de se avaliar possíveis alterações que poderiam descaracterizar o sistema.

As amostras que compunham este estudo compreendiam a nanoemulsão NE-OT-CI, armazenada às temperaturas de 5, 20 e 40 °C, e para verificar se havia semelhança de comportamento entre as duas formulações, a nanoemulsão NE-OT-PC foi armazenada a temperatura de 20 °C, permitindo prever, deste modo, se ambas apresentariam o mesmo comportamento. No decorrer de 30 dias de estudo, as nanoemulsões foram avaliadas em cinco períodos, correspondentes ao tempo 0; 1,5; 7; 15 e 30 dias.

Nas amostras das nanoemulsões foram extraídos e identificados 17 compostos voláteis e esses classificados em monoterpenos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos. Nas Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11 é possível verificar quais foram esses compostos voláteis e as suas respectivas áreas, em cada temperatura estudada e nos tempos pré-estabelecidos. Foi realizada a análise estatística das áreas obtidas de cada um dos compostos voláteis identificados com o propósito de investigar qual a influência da temperatura na estabilidade dos constituintes voláteis das nanoemulsões ao longo dos 30 dias.

Tabela 7 – Área dos compostos voláteis do óleo de tomilho não associado, determinados por GC/FID pela técnica de HS-SPME e expresso em unidades arbitrárias ($\times 10^4$)

Tempo (dias)	0	1,5	7	15	30
Compostos					
<i>Monoterpenos</i>					
α -thujene	5,04	5,04	4,55	4,54	4,52
α -pineno	3,50	3,50	3,16	3,15	3,13
Canfeno	2,12	2,12	1,91	1,90	1,90
β -mirceno	7,07	7,07	6,48	6,44	6,47
4-careno	0,42	0,42	0,38	0,37	0,37
p-cimeno	116,10	116,10	104,47	102,88	102,97
Limoneno	0,74	0,74	0,68	0,67	0,67
γ -terpineno	25,78	25,78	23,25	22,74	22,76
<i>Monoterpenos oxigenados</i>					
Eucaliptol	1,27	1,27	1,10	1,10	1,14
Hidrato de cis-sabineno	0,60	0,60	0,51	0,52	0,55
Linalol	1,91	1,91	1,64	1,68	1,72
Cânfora	0,30	0,30	0,26	0,26	0,27
Éter metil timol	1,57	1,57	1,35	1,38	1,38
Éter metil isotimol	1,76	1,76	1,51	1,55	1,55
Timol	13,54	13,54	10,54	11,63	12,62
Carvacrol	0,84	0,84	0,66	0,70	0,76
<i>Sesquiterpeno</i>					
Cariofileno	2,06	2,06	1,56	1,88	1,88

Tabela 8 – Área dos compostos voláteis da nanoemulsão NE-OT-CI, armazenada à temperatura de 5 °C, determinados por GC/FID pela técnica de HS-SPME e expresso em unidades arbitrárias ($\times 10^4$). Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$)

Tempo (dias)	0	1,5	7	15	30
Compostos					
<i>Monoterpenos</i>					
α -thujene	2,69 ^a	3,26 ^a	3,14 ^a	2,73 ^a	2,97 ^a
α -pineno	1,86 ^a	2,21 ^a	2,14 ^a	1,87 ^a	2,02 ^a
Canfeno	1,18 ^a	1,40 ^a	1,34 ^a	1,21 ^a	1,31 ^a
β -mirceno	4,53 ^a	5,14 ^b	4,83 ^a	4,63 ^a	4,92 ^a
4-careno	0,26 ^a	0,29 ^b	0,27 ^a	0,26 ^a	0,28 ^a
p-cimeno	74,80 ^a	84,42 ^b	78,33 ^a	75,82 ^a	79,67 ^a
Limoneno	0,49 ^a	0,55 ^b	0,50 ^a	0,49 ^a	0,51 ^a
γ -terpineno	17,03 ^a	18,69 ^a	17,08 ^a	16,37 ^a	16,86 ^a
<i>Monoterpenos oxigenados</i>					
Eucaliptol	1,56 ^a	1,74 ^b	1,62 ^a	1,59 ^a	1,70 ^b
Hidrato de cis-sabineno	0,42 ^a	0,48 ^a	0,41 ^a	0,36 ^a	0,30 ^a
Linalol	1,50 ^a	1,58 ^a	1,48 ^a	1,45 ^a	1,55 ^a
Cânfora	0,42 ^a	0,44 ^a	0,42 ^a	0,41 ^a	0,43 ^a
Éter metil timol	1,30 ^a	1,33 ^a	1,25 ^a	1,22 ^a	1,26 ^a
Éter metil isotimol	1,54 ^a	1,57 ^a	1,48 ^a	1,44 ^b	1,48 ^a
Timol	3,76 ^a	4,17 ^a	4,00 ^a	3,52 ^a	3,83 ^a
Carvacrol	0,26 ^a	0,29 ^a	0,27 ^a	0,24 ^a	0,26 ^a
<i>Sesquiterpeno</i>					
Cariofileno	1,84 ^a	1,87 ^a	1,75 ^a	1,71 ^a	1,82 ^a

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística.

Tabela 9 – Área dos compostos voláteis da nanoemulsão NE-OT-CI, armazenada à temperatura de 20 °C, determinados por GC/FID pela técnica de HS-SPME e expresso em unidades arbitrárias ($\times 10^4$). Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$)

Tempo (dias)	0	1,5	7	15	30
Compostos					
<i>Monoterpenos</i>					
α -thujene	2,69 ^a	2,99 ^a	2,35 ^a	2,48 ^a	2,61 ^a
α -pineno	1,86 ^a	2,04 ^a	1,62 ^a	1,70 ^a	1,80 ^a
Canfeno	1,18 ^a	1,31 ^a	1,06 ^a	1,11 ^a	1,18 ^a
β -mirceno	4,53 ^a	4,91 ^a	4,18 ^a	4,31 ^a	4,47 ^a
4-careno	0,26 ^a	0,28 ^a	0,23 ^a	0,23 ^a	0,23 ^a
p-cimeno	74,80 ^a	82,01 ^a	71,41 ^a	71,55 ^a	72,87 ^a
Limoneno	0,49 ^a	0,53 ^a	0,45 ^a	0,45 ^a	0,45 ^a
γ -terpineno	17,03 ^a	17,96 ^a	15,60 ^a	14,62 ^a	14,31 ^a
<i>Monoterpenos oxigenados</i>					
Eucaliptol	1,56 ^a	1,70 ^a	1,55 ^a	1,58 ^a	1,64 ^a
Hidrato de cis-sabineno	0,42 ^a	0,42 ^a	0,33 ^a	0,24 ^a	0,11 ^b
Linalol	1,50 ^a	1,54 ^a	1,45 ^a	1,47 ^a	1,55 ^a
Cânfora	0,42 ^a	0,43 ^a	0,40 ^a	0,41 ^a	0,43 ^a
Éter metil timol	1,30 ^a	1,31 ^a	1,24 ^a	1,20 ^a	1,26 ^a
Éter metil isotimol	1,54 ^a	1,56 ^a	1,48 ^a	1,41 ^a	1,49 ^a
Timol	3,76 ^a	3,75 ^a	3,61 ^a	3,80 ^a	4,39 ^a
Carvacrol	0,26 ^a	0,26 ^a	0,25 ^a	0,26 ^a	0,29 ^a
<i>Sesquiterpeno</i>					
Cariofileno	1,84 ^a	1,84 ^a	1,82 ^a	1,69 ^a	1,84 ^a

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística.

Tabela 10 – Área dos compostos voláteis da nanoemulsão NE-OT-Cl, armazenada à temperatura de 40 °C, determinados por GC/FID pela técnica de HS-SPME e expresso em unidades arbitrárias ($\times 10^4$). Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$)

Tempo (dias)	0	1,5	7	15	30
Compostos					
<i>Monoterpenos</i>					
α -thujene	2,69 ^a	2,87 ^a	2,01 ^a	1,82 ^a	0,97 ^a
α -pineno	1,86 ^a	1,97 ^a	1,41 ^a	1,33 ^a	0,88 ^a
Canfeno	1,18 ^a	1,26 ^a	0,93 ^a	0,89 ^a	0,64 ^a
β -mirceno	4,53 ^a	4,71 ^a	3,63 ^a	3,39 ^a	2,49 ^b
4-careno	0,26 ^a	0,26 ^a	0,19 ^a	0,17 ^a	0,14 ^b
p-cimeno	74,80 ^a	78,42 ^a	63,40 ^a	59,74 ^a	49,73 ^b
Limoneno	0,49 ^a	0,49 ^a	0,38 ^a	0,37 ^a	0,32 ^b
γ -terpineno	17,03 ^a	16,71 ^a	11,98 ^a	10,17 ^a	6,65 ^b
<i>Monoterpenos oxigenados</i>					
Eucaliptol	1,56 ^a	1,69 ^a	1,45 ^a	1,49 ^a	1,47 ^a
Hidrato de cis-sabineno	0,42 ^a	0,22 ^a	-	-	-
Linalol	1,50 ^a	1,58 ^a	1,43 ^a	1,48 ^a	1,56 ^a
Cânfora	0,42 ^a	0,44 ^a	0,40 ^a	0,42 ^a	0,46 ^a
Éter metil timol	1,30 ^a	1,31 ^a	1,16 ^a	1,17 ^a	1,25 ^a
Éter metil isotimol	1,54 ^a	1,57 ^a	1,39 ^a	1,39 ^a	1,50 ^a
Timol	3,76 ^a	4,33 ^a	3,93 ^a	4,14 ^a	4,86 ^b
Carvacrol	0,26 ^a	0,28 ^a	0,25 ^a	0,28 ^a	0,33 ^a
<i>Sesquiterpeno</i>					
Cariofileno	1,84 ^a	1,86 ^a	1,68 ^a	1,67 ^a	1,93 ^a

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística.

Tabela 11 – Área dos compostos voláteis da nanoemulsão NE-OT-PC, armazenada à temperatura de 20 °C, determinados por GC/FID pela técnica de HS-SPME e expresso em unidades arbitrárias ($\times 10^4$). Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$)

Tempo (dias)	0	1,5	7	15	30
Compostos					
<i>Monoterpenos</i>					
α -thujene	3,57 ^a	3,62 ^a	3,12 ^a	3,06 ^a	2,84 ^a
α -pineno	2,44 ^a	2,47 ^a	2,14 ^a	2,10 ^a	1,97 ^a
Canfeno	1,57 ^a	1,60 ^a	1,39 ^a	1,36 ^a	1,30 ^a
β -mirceno	6,01 ^a	6,06 ^a	5,27 ^a	5,19 ^a	4,95 ^b
4-careno	0,35 ^a	0,35 ^a	0,29 ^a	0,28 ^a	0,26 ^b
p-cimeno	101,23 ^a	101,44 ^a	86,97 ^a	84,82 ^a	81,40 ^b
Limoneno	0,65 ^a	0,65 ^a	0,56 ^a	0,54 ^a	0,51 ^b
γ -terpineno	23,28 ^a	22,95 ^a	18,98 ^a	18,04 ^a	16,69 ^b
<i>Monoterpenos Oxigenados</i>					
Eucaliptol	2,00 ^a	2,08 ^a	1,85 ^a	1,85 ^a	1,86 ^a
Hidrato de cis-sabineno	0,52 ^a	0,53 ^a	0,27 ^a	0,14 ^a	-
Linalol	1,90 ^a	2,00 ^a	1,79 ^a	1,78 ^a	1,85 ^a
Cânfora	0,49 ^a	0,53 ^a	0,47 ^a	0,47 ^a	0,49 ^a
Éter metil timol	1,54 ^a	1,59 ^a	1,40 ^a	1,39 ^a	1,43 ^a
Éter metil isotimol	1,79 ^a	1,86 ^a	1,65 ^a	1,64 ^a	1,69 ^a
Timol	3,87 ^a	4,72 ^a	3,92 ^a	3,82 ^a	4,38 ^a
Carvacrol	0,27 ^a	0,33 ^a	0,27 ^a	0,26 ^a	0,30 ^a
<i>Sesquiterpeno</i>					
Cariofileno	2,04 ^a	2,31 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a	2,07 ^a

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística.

Considerando que o timol e o carvacrol são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; FLORES; BECK; SILVA, 2016), estes componentes serão destacados. Deste modo é possível verificar no gráfico (a) da Figura 19 que as formulações foram capazes de manter o timol associado as nanoemulsões quando comparados ao óleo livre. A nanoemulsão NE-OT-CI armazenadas às

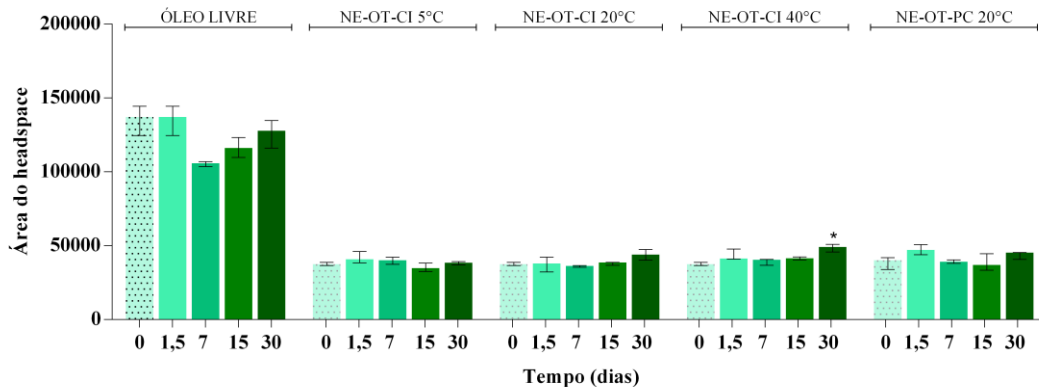
temperaturas de 5 e 20 °C e a nanoemulsão NE-OT-PC à 20 °C, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) na concentração de timol durante os 30 dias de armazenamento quando comparadas aos seus valores iniciais do estudo de estabilidade. Considerando a área do timol obtida no *headspace* do óleo livre e as áreas do timol nessas formulações, as nanoemulsões desenvolvidas foram capazes de reter aproximadamente 70% para a formulação armazenada à 5 °C e aproximadamente 65% para ambas formulações armazenadas a 20 °C, ao final dos 30 dias de experimento. Já para as amostras mantidas à 40 °C, no final dos 30 dias de armazenamento, aproximadamente 60% do timol manteve-se retido nas nanoemulsões, essa redução foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), confirmando a influência da temperatura e a necessidade de seu controle no processo de armazenamento das formulações.

A concentração de carvacrol presente no óleo de tomilho é de, aproximadamente, 2%, o que representa uma quantidade muito pequena. Desta forma, é possível verificar na Figura 19 (b) que independentemente das nanoemulsões (NE-OT-CI e NE-OT-PC) e das temperaturas (5, 20 e 40 °C) não houveram diferenças significativas ($p < 0,05$) para nenhuma formulação durante todo período de armazenamento quando comparadas as suas concentrações iniciais.

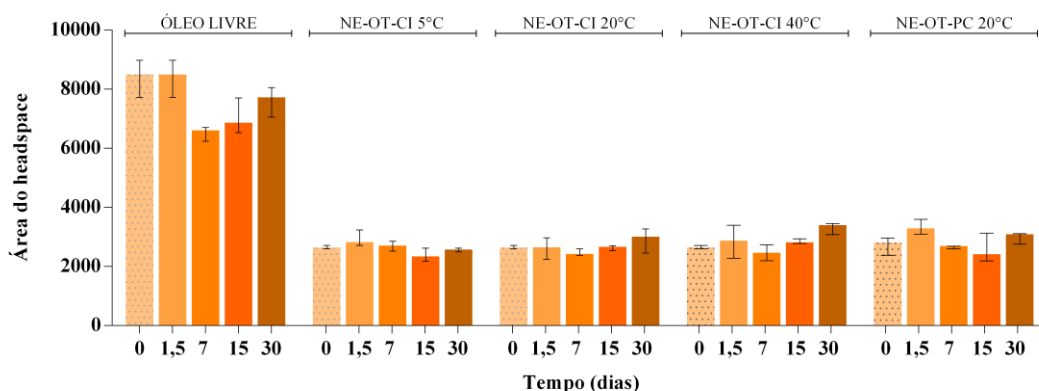
A técnica de microextração em fase sólida, aplicada neste estudo de estabilidade, é uma ferramenta muito utilizada para extração de compostos voláteis, sendo que seu emprego possibilitou acompanharmos o comportamento dos componentes voláteis do óleo essencial de tomilho, presente nas nanoemulsões desenvolvidas, ao longo do tempo. Considerando a aplicabilidade do método e suas vantagens, outras propostas de sua utilização podem ser estudadas, até mesmo com uma possível técnica para avaliar a eficiência de encapsulamento de sistemas nanoestruturados contendo óleos essenciais.

Figura 19 – Gráficos das áreas cromatográficas de timol (a) e carvacrol (b) no decorrer dos 30 dias de armazenamento do *headspace* das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas nas temperaturas de 5, 20 e 40 °C. Os dados foram expressos em mediana \pm intervalo interquartil e analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$; $n = 3$)

(a)



(b)



Os parâmetros físico-químicos são importantes, uma vez que a influência da temperatura pode causar mudanças nessas propriedades e descaracterizar o sistema. O diâmetro médio das gotículas foi analisado e verificou-se diferença estatística no tempo 30 dias para as nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, ambas a 20 °C, comparadas ao tempo inicial do estudo, como é possível verificar na Figura 20 (a). Essas duas nanoemulsões apresentam concentrações diferentes de tensoativos em suas composições e, apesar destas mudanças não representarem alterações nas características dos sistemas, sabe-se que o tensoativo utilizado e a sua quantidade é um dos fatores que tem demonstrado influenciar esta propriedade (BRUXEL et al., 2012).

As nanoemulsões também foram analisadas quanto a uniformidade das gotículas no decorrer do período de armazenamento. Como podemos observar na Figura 20 (b), apesar de

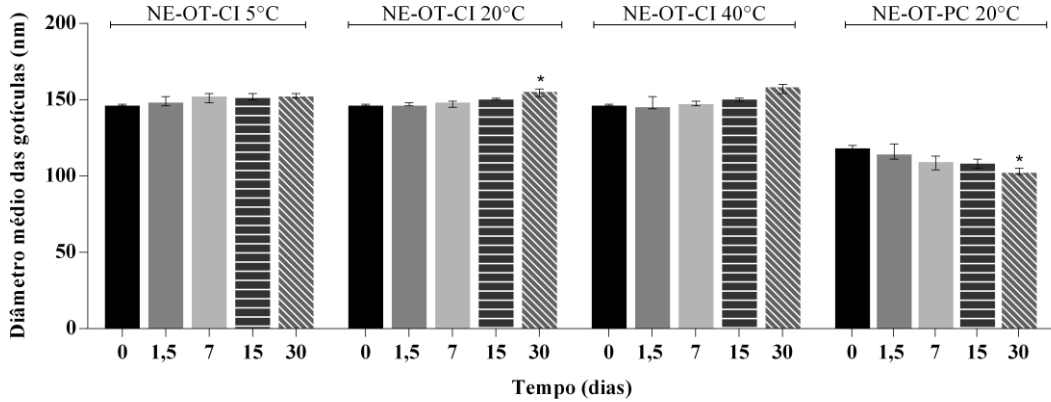
haver diferença estatística ($p < 0,05$) para NE-OT-CI (20 °C) no quinto dia e para a NE-OT-CI (40 °C) no sétimo dia, essas mudanças não ultrapassam o valor de índice de polidispersão de 0,25, o que indica que o sistema continua homogêneo. Já para a nanoemulsão NE-OT-PC (20 °C), não foi verificada diferença estatística, mas os valores de índice de polidispersão são mais elevados quando comparado com a formulação NE-OT-CI, o que demonstra que o sistema possui uma menor uniformidade no tamanho das gotículas.

O resultado da avaliação do potencial zeta pode ser visto na Figura 20 (c), na qual é possível perceber uma diferença significativa para as formulações NE-OT-CI, armazenadas a 5 e 20 °C, um dia após o preparo, em seguida os valores reduziram e estabilizaram, o que não foi visto para a nanoemulsão NE-OT-CI (40 °C) e NE-OT-PC (20 °C) que chegaram a registrar um potencial zeta próximo a -4,6 mV e -4,3, respectivamente. Esta baixa força de repulsão eletrostática entre as cargas superficiais das gotículas tende a provocar um aumento na probabilidade de fenômenos de instabilidade (BRUXEL et al., 2012).

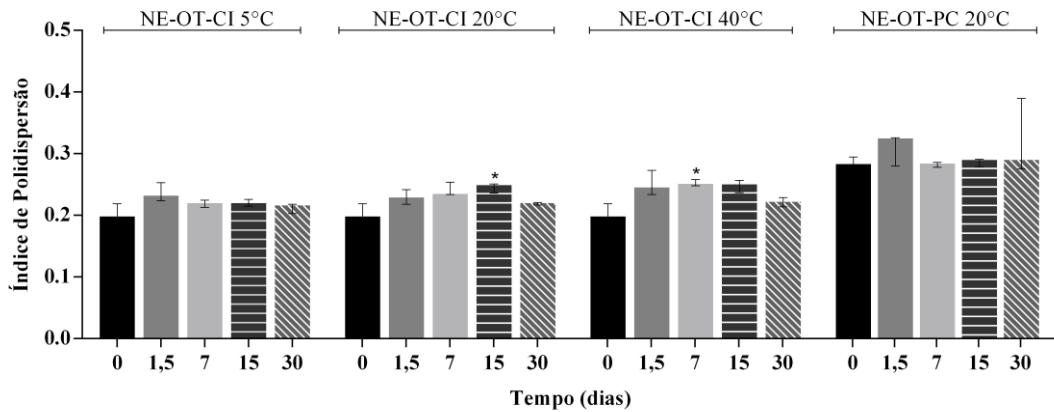
A última propriedade físico-química analisada foi o pH e os resultados estão expressos na Tabela 11. Os potenciais hidrogeniônicos logo após a preparação foram levemente ácidos, em torno de 5. Foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) na nanoemulsão NE-OT-CI (40 °C) que no final dos 30 dias de estudo apresentou um pH próximo a 3,0. Esta variação pode estar relacionada à presença de ácidos graxos provenientes da hidrólise dos tensoativos (BRUXEL et al., 2012), indicando uma possível desestabilização do sistema.

Figura 20 – Gráficos referentes ao diâmetro médio de gotículas (a), índice de polidispersão (b) e potencial zeta (c) das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas nas temperaturas de 5, 20 e 40 °C, por 30 dias. Os dados foram expressos em mediana \pm intervalo interquartil e analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's ($*p < 0,05$; $n = 3$)

(a)



(b)



(c)

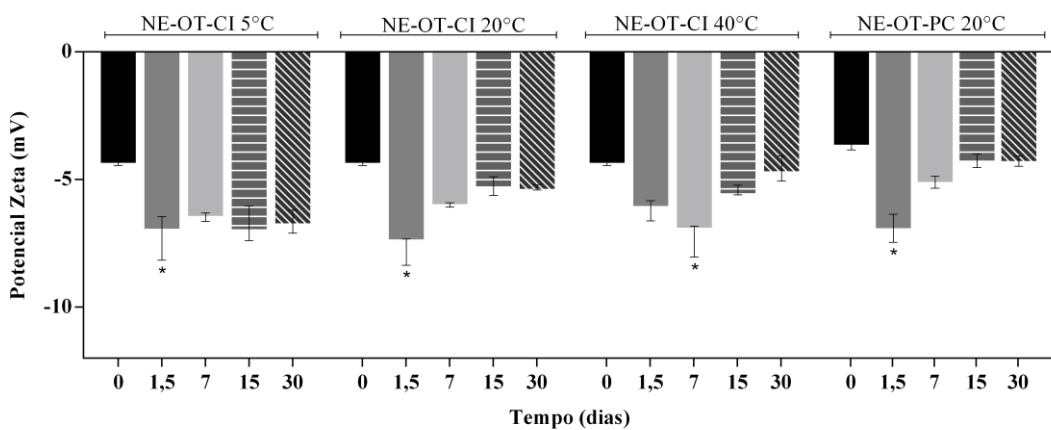


Tabela 12 – Potencial hidrogeniônico das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas nas temperaturas de 5, 20 e 40 °C, por 30 dias. Os dados foram analisados pelo teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn's (média ± desvio padrão, n = 3)

Tempo (dias)	NE-OT-CI	NE-OT-CI	NE-OT-CI	NE-OT-PC
	5 °C	20 °C	40 °C	20 °C
0	5,30 ± 0,00 ^a	5,30 ± 0,00 ^a	5,30 ± 0,00 ^a	5,13 ± 0,00 ^a
1,5	5,30 ± 0,00 ^a	5,30 ± 0,00 ^a	5,30 ± 0,00 ^a	5,13 ± 0,00 ^a
7	5,44 ± 0,11 ^a	6,14 ± 0,02 ^b	4,82 ± 0,04 ^a	5,63 ± 0,29 ^a
15	5,45 ± 0,14 ^a	6,05 ± 0,05 ^a	4,11 ± 0,13 ^a	5,51 ± 0,45 ^a
30	5,33 ± 0,05 ^a	5,87 ± 0,05 ^a	3,58 ± 0,10 ^b	5,16 ± 0,54 ^a

*Letras diferentes na mesma coluna representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

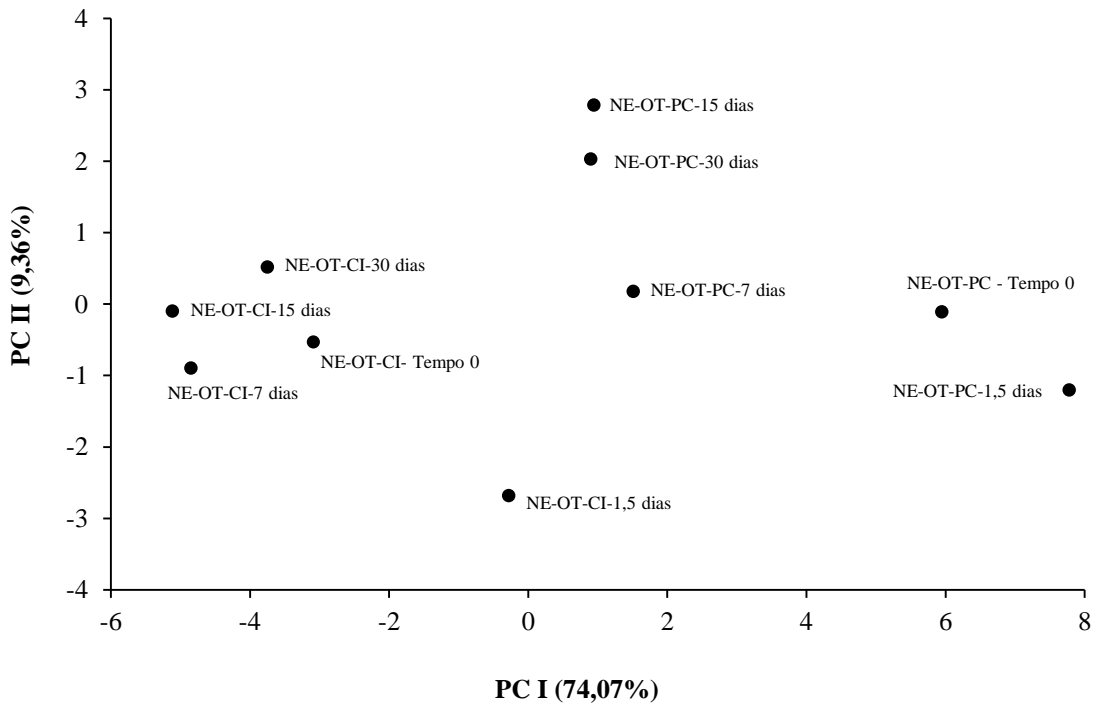
Considerando o volume de dados obtidos e para melhor interpretação dos resultados e compreensão da influência das variáveis neste estudo de estabilidade, foi realizada uma análise exploratória multivariada denominada de Análise de Componentes Principais (ACP). A ACP consegue transformar as variáveis dos dados originais em um conjunto menor de novas variáveis que são chamadas de componentes principais (HONGYU; SANDANIELO; JUNIOR, 2016). O que caracteriza esse novo conjunto formado é a ortogonalidade e sua vantagem está em normalmente reter a maior parte das informações em poucas variáveis, reduzindo a dimensionalidade dos dados sem perder informação (SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004). A ACP foi aplicada e a matriz de dados foi composta pela média da área total de cada componente volátil que constitui o óleo e a média das propriedades físico-químicas: tamanho de gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.

A constituição das nanoemulsões estudadas diferem pela concentração total de agentes emulsionantes utilizados em sua obtenção, deste modo uma ACP foi aplicada para a NE-OT-CI e NE-OT-PC, ambas armazenadas à temperatura de 20 °C, com o propósito de identificar a influência da concentração de tensoativo na representatividade das variáveis. Na Figura 21 (a) mostra a disposição dos tratamentos ao longo do PC I (*Principal Component I*) e PC II (*Principal Component II*), estes representam 83,43% da variância total da matriz de dados. De maneira geral, o PC I discriminou a NE-OT-PC (com menor concentração de tensoativo em sua composição) da NE-OT-CI (com maior concentração de tensoativo), sendo que essa discriminação foi mais evidente para tempos 0 e 1,5 de NE-OT-PC contra os tempos 0, 7, 15 e

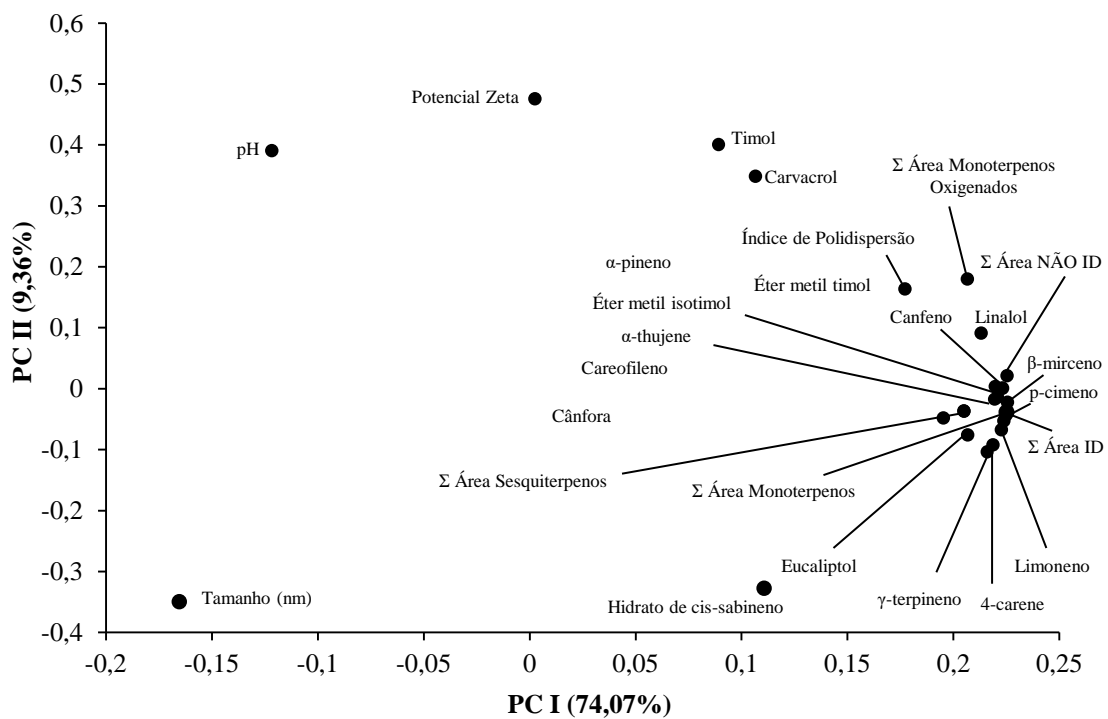
30 dias para NE-OT-CI. No gráfico das variáveis disposto na Figura 21 (b) os escores das variáveis são baseados nos coeficientes gerados para cada variável original a partir da área encontrada no *headspace* para cada uma das amostras, nos valores nanométricos dos diâmetros médios das gotículas ou nos valores do índice de polidispersão, potencial zeta e pH, nota-se que a variável de tamanho de gotícula (nm) foi a que mais influenciou para a discriminação da NE-OT-CI, sendo que todas as demais variáveis avaliadas foram correlacionadas com NE-OT-PC, principalmente, nos tempos de 0 e 1,5 dias. Em relação ao PC II [Fig 21 (a)] NE-OT-CI no tempo de 1,5 dias foi significativamente discriminada de NE-OT-PC 15 e 30 dias, sendo esta associada, principalmente, pela menor concentração de hidrato de cis-sabineno em NE-OT-CI 1,5 dias e pelos maiores valores de potencial zeta e maiores concentrações de timol e carvacrol no *headspace* em NE-OT-PC 15 e 30 dias [Fig 21 (b)].

Figura 21 – Análise de componentes principais das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC armazenadas a 20 °C durante 30 dias, na qual o gráfico (a) representa as amostras e o (b) as variáveis

(a)



(b)

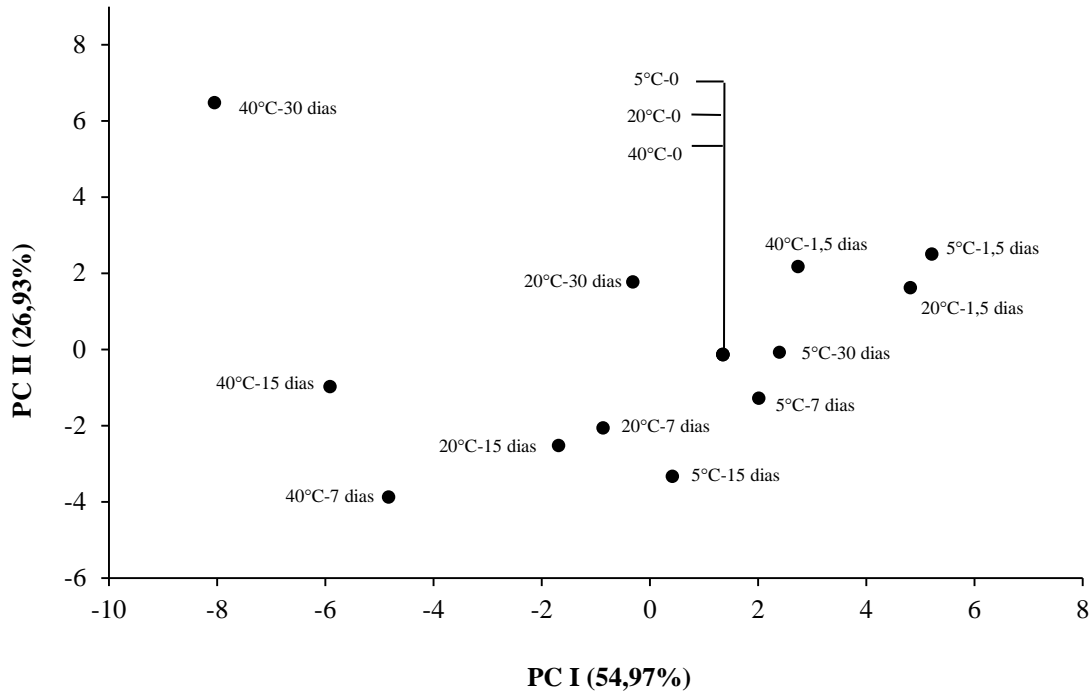


Após analisarmos a interferência da composição quantitativa de tensoativos nas nanoemulsões, outro interesse foi entender a influência da temperatura no processo de armazenamento. A ACP foi realizada com as informações referentes a NE-OT-CI, armazenadas nas temperaturas de 5, 20 e 40 °C.

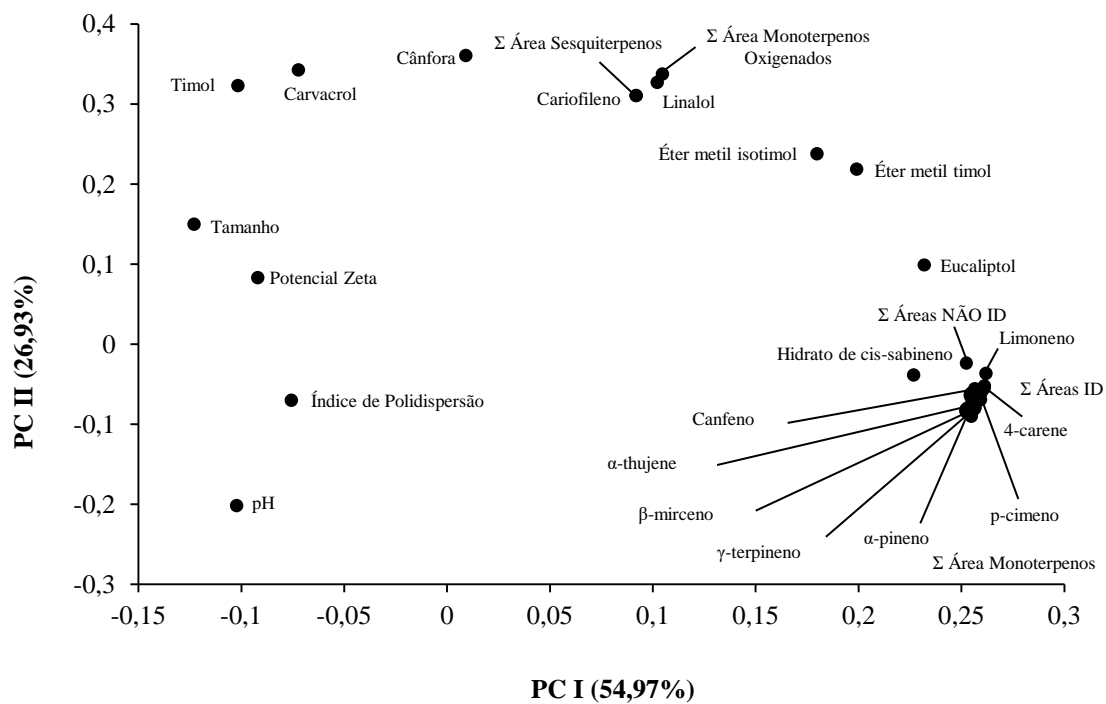
A Figura 22 (a) mostra o gráfico de escore que apresenta a distinção entre as amostras na qual os componentes principais, PCI e PC II, representam 81,9% da variância total. De maneira geral, o PC I, discriminou as amostras pela maior (40 °C) e menor (5 °C) temperatura em que elas foram armazenadas, sendo que essa diferença foi mais evidente nos tempos de 7, 15 e 30 dias. Na Figura 22 (b) está representado o gráfico das variáveis na qual a temperatura de 40 °C foi correlacionada com maiores valores das variáveis de caracterização físico-química da nanoemulsão e maiores concentrações de timol e carvacrol no *headspace*, enquanto que, principalmente, a nanoemulsão armazenada na temperatura de 5 °C foi correlacionada com as variáveis de compostos voláteis. Deste modo, é possível observar que as nanoemulsões armazenadas a 5 °C mantêm suas propriedades físico-químicas, e não há perdas significativas de compostos voláteis. O PC II distinguiu as amostras armazenadas em 40 °C nos tempos de 7 e 30 dias [Fig 22 (a)]. Sendo que, para as amostras armazenadas a temperatura de 40 °C, há diferença nas propriedades físico-químicas a partir do sétimo dia, correlacionadas principalmente com o índice de polidispersão e pH, apesar de não serem todas diferenças estatisticamente significativas, aumentam a possibilidade de desestabilização do sistema. A correlação encontrada está relacionada a elevada abundância dos monoterpênos oxigenados, timol e carvacrol aos 30 dias de armazenamento às temperaturas de 20 e 40 °C [Fig 22 (b)].

Figura 22 – Análise de componentes principais da nanoemulsão NE-OT-CI armazenada à 5, 20 e 40 °C, durante 30 dias, na qual o gráfico (a) representa as amostras e o (b) as variáveis

(a)



(b)



5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

A atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho é bastante relatada na literatura, isso devido à presença dos monoterpenos timol e carvacrol, responsáveis por essa propriedade (ROCHA, 2013; FLORES, BECK, SILVA, 2016; ASPREA et al., 2017). A fim de verificar a atividade contra fungos exercida pelo óleo a partir das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, foi realizado concomitante ao estudo de estabilidade das nanoemulsões por cromatografia gasosa utilizando a técnica de microextração em fase sólida, o teste de difusão em ágar frente à levedura *C. albicans*. Os testes foram realizados após a preparação das formulações e depois de 30 dias de armazenamento nas temperaturas de 5, 20 e 40 °C. Os resultados (Tabela 13) são referentes ao diâmetro dos halos de inibição formados.

Tabela 13 – Diâmetro dos halos de inibição (mm) determinados na avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do timol (padrão) e das nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, armazenadas em diferentes temperaturas (5, 20 e 40 °C)

Tempo	Amostras	Temperatura de Armazenamento	Diâmetro Médio do Halo de Inibição (mm)
0	TIMOL	-	15,53 ± 0,57
	NE-OT-CI	-	16,03 ± 0,37
	NE-OT-PC	-	16,39 ± 2,50
30 dias	TIMOL	-	15,76 ± 0,46
	NE-OT-CI	5 °C	13,91 ± 0,38
	NE-OT-CI	20 °C	13,57 ± 0,52
	NE-OT-CI	40 °C	11,23 ± 0,18
	NE-OT-PC	20 °C	14,77 ± 0,57

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística.

Com base nos resultados, verificou-se que ambas formulações, NE-OT-CI e NE-OT-PC, não apresentaram diferença após a preparação entre si e nem quando comparadas ao padrão timol na mesma concentração, apresentando halos de inibição em torno de 16 mm. Decorridos 30 dias, houve uma diminuição nos halos de inibição das formulações NE-OT-CI em todas as temperaturas de armazenamento. Nas temperaturas de 5 °C e 20 °C a capacidade de inibição fúngica das formulações decaíram quando comparadas as mesmas no tempo

inicial do teste, porém, uma maior diminuição no halo de inibição foi observada na formulação armazenada a 40 °C. Este fato possivelmente se explica pela desestabilização do sistema e consequente perda de timol e carvacrol quando as nanoemulsões foram armazenadas a altas temperaturas. Já a formulação NE-OT-PC não apresentou diferença após 30 dias de armazenamento a temperatura de 20 °C em relação ao tempo inicial e nem em relação às formulações NE-OT-CI armazenadas a 5 e 20 °C. Os excipientes e o solvente não apresentaram atividade antifúngica, garantindo a ação exclusiva do óleo.

Estes resultados corroboram com a Análise do Composto Principal, na qual foi verificado que houve uma maior concentração de timol e carvacrol no *headpace* no trigésimo dia de teste nas formulações armazenadas à temperatura de 40 °C, sugerindo uma menor associação do óleo a nanoemulsão, o que explica os menores diâmetros dos halos de inibição e, conseqüentemente, menor atividade antifúngica.

Romero e colaboradores (2009) investigaram a atividade antifúngica do óleo de tomilho frente a microrganismos que causam danos à agricultura, como *Myrothecium verrucaria*, *Corynespora cassiicola*, *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor* e *Colletotrichum musae*. A concentração necessária para inibição variou em função do microrganismo, entre 5 e 200 µg/mL. Deste modo, o estudo concluiu que este óleo pode ser usado como controle alternativo de doenças que incidem sobre as plantas, causadas por diversos fungos.

Em 2011, Almeida e colaboradores avaliaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum basilicum*), piprioca (*Cyperus articulatus*), canela da china (*Cinnamomum cassia*), tomilho (*T. vulgaris*) e palmarosa (*Cymbopogon martinii*) frente à cepas de *C. albicans* pela metodologia da difusão em disco de papel a partir do diâmetro dos halos de inibição. Com exceção do óleo de piprioca, todos os outros óleos testados apresentaram atividade antifúngica, com halos de inibição em torno de 27 e 30 mm.

Guerra-Rosas e colaboradores (2017) analisaram a atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo óleos essenciais de tomilho, orégano, capim-limão ou tangerina e pectina com alto teor de metoxila contra *E. coli* e *L. innocua* durante o período de armazenamento de 56 dias, objetivando torná-los descontaminantes em produtos alimentícios. A maior atividade antimicrobiana foi verificada para o óleo essencial de capim-limão, seguida pelo de orégano, tomilho e tangerina+pectina. Deste modo, concluiu-se que a atividade antimicrobiana das formulações está relacionada diretamente ao tipo de óleo utilizado e que os mesmos apresentaram maior atividade contra *E. coli* quando comparada a *L. innocua*. Houve uma diminuição significativa da atividade contra esses patógenos ao longo do período

de armazenamento, independentemente do óleo essencial, o que está relacionado a perda de compostos voláteis ao longo do tempo.

5.6 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO TIMOL A PARTIR DAS NANOEMULSÕES

O estudo de liberação *in vitro* do timol a partir das nanoemulsões e do óleo em solução metanólica foi realizado em sacos de diálise como barreira de difusão. Para a quantificação do timol nos diferentes tempos, o método analítico foi validado e mostrou-se específico, pois não houve interferência do meio receptor na quantificação do composto; linear na faixa de concentração de 1,5 – 40 µg/mL ($y = 16186x - 676,42$; $r^2 = 0,9999$), apresentando regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} = 9,0200 > F_{\text{tabelado}} = 4,96$) e ausência de desvio de linearidade ($F_{\text{calculado}} = 0,0003 > F_{\text{tabelado}} = 3,71$), além de ser preciso (DPR = 1,20% e 1,31% para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente) e apresentar limites de detecção e de quantificação de 0,18 µg/mL e 0,59 µg/mL, respectivamente.

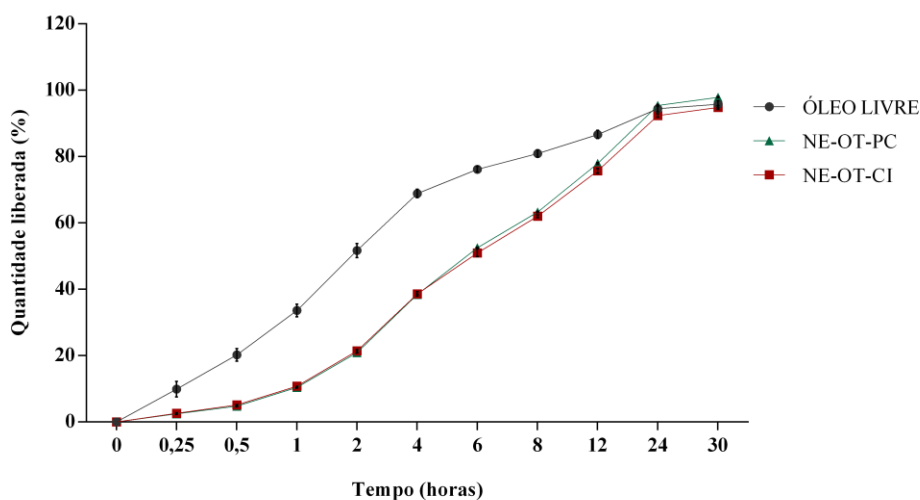
Os resultados obtidos para as nanoemulsões e para o óleo livre estão resumidos na Figura 23 (a) e (b). Como já esperado, o timol presente na solução (óleo livre) apresentou uma liberação mais rápida quando comparado ao mesmo associado às nanoemulsões. A Figura 23 (a) demonstra o perfil de liberação das amostras, na qual verifica-se que a solução do óleo, em torno de duas horas, liberou aproximadamente 50%, o equivalente a 2.480 µg/mL de timol, sendo que para o óleo incorporado nas nanoemulsões NE-OT-CI e NE-OT-PC, essa concentração só foi alcançada em torno de seis horas de estudo. Um platô na liberação do timol foi alcançado em 24 horas tanto para as nanoemulsões quanto para a solução do óleo livre.

A fim de avaliar a capacidade das nanoemulsões em sustentar a liberação do timol, foi utilizada a razão da porcentagem liberada em 15 minutos (0,25 h) e após 24 h, em relação ao tempo final do experimento (30 h): [%R30h / %R0,25h] e [%R30h / %R24h]. Conforme demonstrado na Figura 23 (b), a razão [%R30h / %R0,25h] para ambas nanoemulsões, NE-OT-CI ($35,5 \pm 1,23$) e NE-OT-PC ($39,6 \pm 3,25$), foram significativamente maiores ($p < 0,01$) do que para o óleo livre ($10,1 \pm 2,53$), indicando que a liberação do timol a partir das nanoemulsões ocorreu de forma gradual ao longo do experimento em comparação ao observado para o óleo em solução, não associado ao nanosistema. Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas nanoemulsões. Para a razão [%R30h / %R24h] não houveram diferenças entre as formulações (NE-OT-CI e NE-OT-PC) e a solução de óleo

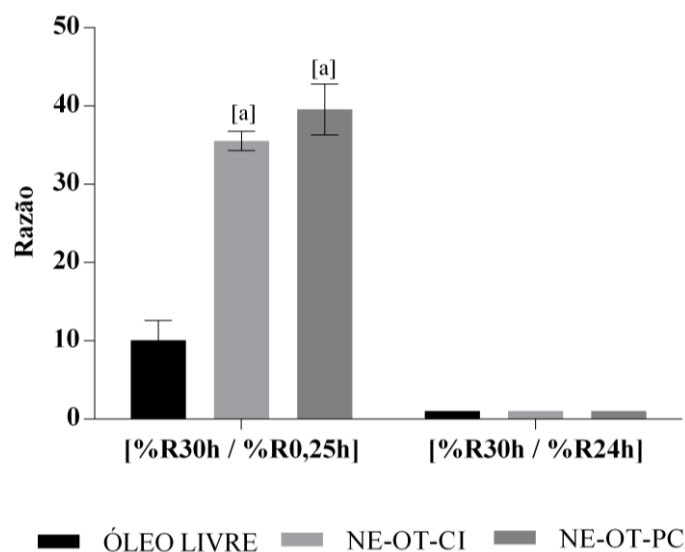
livre, obtendo-se valores de $1,03 \pm 0,00$; $1,03 \pm 0,01$ e $1,01 \pm 0,01$, respectivamente. Ou seja, após 24 horas, a quantidade de timol liberada é semelhante e alcança valores próximos a 100%. Estes resultados demonstram a capacidade das nanoemulsões em controlar a liberação do timol por um período de 24 h, possibilitando obter concentrações graduais do mesmo ao longo deste período.

Figura 23 – (a) Resultados obtidos no estudo de liberação *in vitro* de timol a partir das nanoemulsões (NE-OT-CI e NE-OT-PC) e da solução metanólica (óleo livre) por um período de 30 h. (b) Razão do percentual liberado nos tempos de 0,25 h [%R30h / %R0,25h] e 24 h [%R30h / %R24h]. Os dados foram representados como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,01$; $n = 3$)

(a)



(b)



[a] = valor diferente de [%R30h / %R0,25h] para NE-OT-CI e NE-OT-PC

O controle na liberação de substâncias ativas pode auxiliar na diminuição da toxicidade de alguns bioativos, reduzir os efeitos adversos, além de aumentar o intervalo de administração e, deste modo, facilitar a aceitabilidade pelo paciente (BIZERRA, SILVA; 2016).

Asprea e colaboradores (2017) desenvolveram nanociclos (compostos por fosfatidilcolina, colesterol e íons cálcio) contendo óleo essencial de *T. vulgaris* com o objetivo de estudar sua atividade antioxidante e antimicrobiana como conservante de alimentos. O estudo de liberação *in vitro* de timol e carvacrol a partir dos nanociclos, na concentração de 1 mg/mL, foi realizado. O meio de liberação utilizado foi tampão fosfato-salino (pH 7,4) e o estudo foi realizado a temperatura de 37 °C, por 24 horas. A liberação do timol atingiu 36% e carvacrol 26% na primeira hora do teste. Após 6 h, 31% e 41% de carvacrol e timol foram liberados, respectivamente. Deste modo, os autores concluíram que as formulações desenvolvidas representam um vetor inovador para a liberação prolongada do óleo essencial de tomilho sem alterar suas propriedades funcionais.

A partir destes resultados, observa-se que as nanoemulsões desenvolvidas neste trabalho possibilitaram controlar a liberação do timol por um maior período de tempo, demonstrando a influência do tipo de nanocarreador no controle da liberação de substâncias.

6 CONCLUSÃO

- A proposta deste trabalho foi obter nanoemulsões contendo óleo essencial de tomilho a partir de uma técnica de alta energia de emulsificação, sem utilizar temperatura e solventes orgânicos. As formulações desenvolvidas a partir do planejamento experimental apresentaram parâmetros físico-químicos satisfatórios, como tamanho nanométrico, índice de polispersão adequado e teor de timol próximo ao teórico.
- O estudo de estabilidade demonstrou que a nanoemulsão NE-OT-CI apresentou propriedades físico-químicas mais adequadas durante os 100 dias de armazenamento nas temperaturas de 5 e 25 °C quando comparadas a NE-OT-PC.
- A aplicação da Análise do Componente Principal proporcionou melhor interpretação dos resultados no estudo de estabilidade dos compostos voláteis do óleo essencial de tomilho pela técnica de HS-SPME realizada por cromatografia gasosa. Foi possível verificar a interferência da temperatura nos componentes voláteis do óleo de tomilho associado as nanoemulsões durante o armazenamento das formulações estudadas. Foi evidenciado maior desestabilização das nanoemulsões armazenadas em altas temperaturas (40 °C), o que diminui o tempo de vida útil da formulação.
- A avaliação *in vitro* da atividade antifúngica frente a leveduras de *C. albicans* corrobora com o estudo de estabilidade dos compostos voláteis, demonstrando que com a diminuição na concentração dos compostos voláteis das nanoemulsões armazenadas a 40 °C, houve diminuição nos halos de inibição e conseqüentemente menor atividade antifúngica.
- O estudo de liberação *in vitro* demonstrou o controle da liberação do timol a partir das nanoemulsões desenvolvidas (NE-OT-CI e NE-OT-PC) em relação ao óleo essencial de tomilho livre em solução.
- A nanoemulsão NE-OT-CI (armazenadas a 5 e 20°C) mostrou-se a formulação mais promissora, mantendo-se estável e controlando a liberação do óleo sem perder a atividade biológica. Mais estudos devem ser realizados para que essas formulações possam ser utilizadas de maneira mais ampla explorando sua atividade antifúngica em

diversas áreas, inclusive para que possa futuramente ser uma alternativa para o tratamento fúngico em humanos.

REFERÊNCIAS

- ABAIDE, E. R. **Extração de óleo da polpa de abacate utilizando gás liquefeito de petróleo pressurizado e dióxido de carbono supercrítico como solventes.** 2016. 62 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.
- ACEVEDO-FANI, A.; SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, Lérida, v.47, p. 168-177, 2015.
- ALMEIDA, L. F. D.; CAVALCANTI, Y. W.; VIANA, W. P.; LIMA, E. O. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 14, n. 4, p. 51-56, 2011.
- ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de emulsões submicrométricas: aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, Porto Alegre, v. 27, n. 5, p. 780-788, 2008.
- ALMEIDA, M. P.; ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L.; CRESPIAN, E.R. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica. **Latin American Journal of Science Education**, Campo Mourão, v. 2, n. 2, p. 1-14, 2015.
- ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol.** 2015. 26 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química)-Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, MG, 2015.
- ARTIGA-ARTIGAS, M.; GUERRA-ROSAS, M. I.; MORALES-CASTRO, J.; SALVIA-TRUJILLO, L.; MARTÍN-BELLOSO. Influence of essential oils and pectin on nanoemulsion formulation: A ternary phase experimental approach. **Food Hydrocolloids**, Lleida, v. 81, p. 209-219, 2018.
- ASPREA, M.; LETO, I.; BERGONZI, M. C.; BILIA, A. R. Thyme essential oil loaded in nanocochleates: Encapsulation efficiency, in vitro release study and antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, Florença, v. 77, p. 497-502, 2017.
- ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- ATHAYDES, G. A. **Clonagem, caracterização e expressão de genes envolvidos na síntese de compostos isoprenóides em *Eucalyptus grandis*.** 2010. 111 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Tetuão, v. 46, p. 446-475, 2008.

BAKKE, H. A.; LEITE, A. S. M.; SILVA, L. B. Estatística multivariada: aplicação da análise fatorial na Engenharia de Produção. **Revista Gestão Industrial**, Ponta Grossa, v. 04, n. 04, p. 01-14, 2008.

BALDIM, I.; TONANI, L.; VON ZESKA KRESS, M. R.; OLIVEIRA, W. P. *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti Candida agent. **Industrial Crops & Products**, Ribeirão Preto, v. 127, p. 73-81, 2019.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, Ouagadougou, v. 17, p. 3989-4006, 2012.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Recife, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BERNARDI, D. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase**. 2011. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011.

BERWICK, A. **Aromaterapia holística: O equilíbrio entre o corpo e o espírito através dos óleos essenciais**. Rio de Janeiro, 1996. 270 p.

BIASE, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1. ed. Curitiba, 2009. 160 p.

BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, Três Lagoas, v. 2, n. 3, p. 1-12, 2016.

BORRIN, T. R. **Nanoemulsões produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP) para encapsulação de curcumina: parâmetros de produção, estabilidade físico-química e incorporação em sorvete**. 2015. 114 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais)-Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

BORTHAKUR, P.; BORUAH, P. K.; SHARMA, B.; DAS, M. R. Nanoemulsion: preparation and its application in food industry. **Nanotechnology in the Agri-Food Industry**, Jorhat, p. 153-191, 2016.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **Pharmaceutical Nanotechnology**, Lion, v. 280, p. 241-251, 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade**. Brasília, 2019. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade.html>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

BRITO, A. C.; PEREIRA, D. A.; AMARAL, C. L. F. Influência da temperatura na germinação de sementes de *ocimum canum* sims. **Revista caatinga**, Jequié, v. 19, n.4, p. 397-401, 2006.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, Hamburgo, v. 67, p. 21-33, 2004.

BRUXEL, F.; LAUX, M. WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, Porto Alegre, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BUSATO, N. V.; SILVEIRA, J. C.; COSTA, A. O, S.; JUNIOR, E. F. C. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 9, p. 1574-1582, 2014.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendência dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, Iporá, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CHANG, Y.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Physical Properties and Antimicrobial Efficacy of Thyme Oil Nanoemulsions: Influence of Ripening Inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Amherst, v. 60, p. 12056-12063, 2012.

CHANG, Y.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). **Food Chemistry**, Amherst, v. 172, p. 298-304, 2015.

CHAVES, A. T. C. A. **Otimização do processo de produção de biodiesel etílico do óleo de girassol (*Helianthus annuus*) aplicando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

CHEN, Y.; YANG, X.; ZHAO, L.; ALMÁSY, L.; GARAMUS, V. M.; WILLUMEIT, R.; ZOU, A. Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble drug. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Xangai, v. 455, p. 36-43, 2014.

CHHIPA, H. Nanopesticide: Current Status and Future Possibilities. **Agricultural Research & Technology: Open Access Journal**, Índia, v. 5, n. 1, p. 1-4, 2017.

CONTRI, R. V.; SOARES, R. M. D., POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Structural analysis of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, Porto Alegre, v. 42, p. 234-242, 2014.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Revista Diversitas**, Arapiraca, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

DAMASCENO, F. C. **Microextração em fase sólida no modo headspace aplicada ao estudo de substâncias voláteis de plantas infestadas por galhas foliares entomógenas**. 2007. 143 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

- DIVSALAR, A.; SABOURY, A. A.; NABIUNI, M.; ZARE, Z.; KEFAYATI, M. E.; SEYEDARABI, A. Characterization and side effect analysis of a newly designed nanoemulsion targeting human serum albumin for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Teerã, v. 98, p. 80-84, 2012.
- DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, Singapura, v. 28, p. 637-646, 2003.
- FEHLBERG, I. **Terpenos e Fenilpropanoides de *Myrcia guianensis* (MYRTACEAE)**. 2011. 121 f. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federa da Bahia, Salvador, BA, 2011.
- FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química nova na escola**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.
- FLORES, F.C.; BECK, R. C. R.; SILVA, C.B. Essential Oils for Treatment for Onychomycosis: A Mini-Review. **Mycopathologia**, Santa Maria, v. 181, p. 9-15, 2016.
- FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; SILVA, C. B. Atividade antifúngica de nanocarreadores contendo óleo de melaleuca no crescimento de *C. albicans*: um estudo do perfil de inibição. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 37, p. 01-06, 2015.
- FLORES, F. C.; ROSSO, R. S.; CRUZ, L.; BECK, R. C. R.; SILVA, C.B. An innovative polysaccharide nanobased nail formulation for improvement of onychomycosis treatment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Santa Maria, v. 100, p. 56-63, 2017.
- FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São José dos Campos, v. 25, p. 1-9, 2015.
- FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Porto Alegre, v. 23, n. 4, p. 558-566, 2004.
- GIARRATANA, F.; MUSCOLINO, D.; BENINATI, C.; GIUFFRIDA, A.; PANEBIANCO, A. Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. **Experimental Parasitology**, Messina, v. 142, p. 7-10, 2014.
- GIONGO, J. L.; VAUCHER, R. A.; OURIQUE, A. F.; STEFFLER, M. C. R.; FRIZZO, C. P.; HENNEMMAN, B.; SANTOS, R. C. V.; LOPES, L. Q. S.; RECH, V. C.; NISHIHARA, S. K.; RAFFIN, R. R. P.; GOMES, P.; STEPPE, M. Development of nanoemulsion containing *pelargonium graveolens* oil: characterization and stability study. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Santiago, v. 8, n. 12, p. 271-276, 2016.
- GODOI, S. N.; QUATRIN, P. M.; SAGRILLO, M. R.; NASCIMENTO, K.; WAGNER, R.; KLEIN, B.; SANTOS, R. C. V.; OURIQUE, A. F. Evaluation of Stability and In Vitro Security of Nanoemulsions Containing *Eucalyptus globulus* Oil. **BioMed Research International**, Santa Maria, v. 2017, p. 1-10, 2017.

GOMES, G. L. G. C. **Alterações metabólicas de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito.** 2011. 104 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

GONÇALVES, N. D. **Encapsulação de óleo essencial de tomilho e avaliação como potencial ingrediente funcional tecnológico.** 2016. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo)-Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2016.

GOTO, P. L. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por polimerização *in situ* a partir de nanoemulsões produzidas por inversão de fases.** 2011. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

GUERRA-ROSAS, M. I.; MORALES-CASTRO, J.; OCHOA-MARTÍNEZ, L. A.; SALVIA-TRUJILLO, L.; MARTÍN-BELLOSO, O. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, Durango, v. 52, p. 438-446, 2016.

GUERRA-ROSAS, M. I.; MORALES-CASTRO, J.; CUBERO-MÁRQUEZ, M. A.; SALVIA-TRUJILLO, L.; MARTÍN-BELLOSO, O. Antimicrobial activity of nanoemulsions containing essential oils and high methoxyl pectin during long-term storage. **Food Control**, Durango, v. 77, p. 131- 138, 2017.

GÜNDEL, S. S.; SOUZA, M. E.; QUATRIN, P.M.; KLEIN, B.; WAGNER, R.; GÜNDEL, A.; VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C. V.; OURIQUE, A. F. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, Santa Maria, v. 118, p. 268-276, 2018a.

GÜNDEL, S. S.; VELHO, M. C.; DIEFENTHALER, M. K.; FAVARIN, F. R.; COPETTI, P. M.; FOGAÇA, A. O.; KLEIN, R. W.; WAGNER, R.; GÜNDEL, A.; SAGRILLO, M. R.; OURIQUE, A. F. Basil oil-nanoemulsions: Development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Santa Maria, v. 46, p. 378-383, 2018b.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, Porto Alegre, v. 2, p. 147-157, 2007.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; JUNIOR, G. J. O. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, v. 5, n. 1, p. 83-90, 2016.

HOSSAIN, F.; FOLLET, P.; SALMIERI, S.; VU, K. D.; FRASCHINI, C.; LACROIX, M. Antifungal activities of combined treatments of irradiation and essential oils (EOs) encapsulated chitosan nanocomposite films in in vitro and in situ conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Laval, v. 295, p. 33-40, 2019.

HUYNH, N.T.; PASSIRANI, C.; SAULNIER, P.; BENOIT, J. P. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. **International Journal of Pharmaceutics**, Angers, v. 379, p. 201–209, 2009.

IKA. Manual Ultra-turrax[®] T 25 digital. Staufen, p. 194, 2019.

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JAKIEMIU, E. A. R.; SCHEER, A. P.; OLIVEIRA, J. S.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I.; DESCHAMPS, C. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Semina: Ciências Sociais e Humanas**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 683-688, 2010.

KATSOULI, M.; GIANNOU, V.; TZIA, C. A Comparative Study of O/W Nanoemulsions Using Extra Virgin Olive or Olive-Pomace Oil: Impacts on Formation and Stability. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Zografou, v. 95, p. 1341-1353, 2018.

KHALEQUE, M. A.; KEYA, C. A.; HASAN, K. N.; HOQUE, M. M.; INATSU, Y.; BARI, M. L. Use of cloves and cinnamon essential oil to inactivate *Listeria monocytogenes* in ground beef at freezing and refrigeration temperatures. **LWT - Food Science and Technology**, Bangladesh, v. 74, p. 219-223, 2016.

KOURNIATIS, L. R.; SPINELLI, L. S.; MANSUR, C. R. E. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 295-300, 2010.

LIMA, R. G. **Síntese e caracterização de nanopartículas poliméricas para veiculação de ligninas bioativas**. 2018. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais)-Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, SP, 2018.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J. C.; ANDRADE, M. A.; MELO, B. A.; RODRIGUES, V. G. Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2010.

LIMA, R. M. **Óleos essenciais como alternativa inovadora para o tratamento da esporotricose**. 2017. 109 p. Dissertação (Mestrado em Saúde)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

LIMA, W. P. **Efeito dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Cinnamomun zeylanicum* e seus componentes majoritários sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici***. 2018. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2018.

LOPES, M. M. A. **Efeitos da luz pulsada no metabolismo e nas características físico-químicas de frutos de manga “tommy atkins” durante o armazenamento**. 2015. 145 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2015.

MARCHESE, A.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; LORENZO, A. D.; NABAVI, S. F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, Gênova, v. 210, p. 402-414, 2016.

MARCHIORI, M. L.; LUBINI, G.; DALLA NORA, G.; FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; OURIQUE, A. F.; BASTOS, M. O.; RIGO, L. A.; SILVA, C. B.; TEDESCO, S. B.; BECK, R. C. R. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Santa Maria, v. 36, n. 8, p. 962-971, 2010.

MATOS, S. P.; LUCCA, L. G.; KOESTER, L. S. Essential oils in nanostructured systems: challenges in preparation and analytical methods. **Talanta**, Porto Alegre, v. 195, p. 204-214, 2018.

MEHMOOD, T.; AHMAD, A.; AHMED, A.; AHMED, Z. Optimization of olive based O/W nanoemulsions prepared through ultrasonic homogenization: A response surface methodology approach. **Food Chemistry**, Rawalpindi, v. 229, p. 790-796, 2017.

MEIRELLES, A. A. D. **O papel da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na estabilização de emulsões envolvendo hexadecano e uma fase aquosa**. 2016. 137 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do Delineamento Composto Central em experimentos com alto coeficiente de variação**. 2012. 80 p. Dissertação (Mestrado em Estatística Aplicada e Biometria)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

MEZADRI, H. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos**. 2010. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; CARVALHO, M. L. M.; MACHADO, S. M. F.; ANDRADE, M. A.; OLIVEIRA, C. M. Análise comparativa do potencial alelopático do óleo essencial de *Thymus vulgaris* e seu constituinte majoritário na germinação e vigor de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). **Exacta**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 45-53, 2015.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Varanasi, v. 6, p. 9-24, 2010.

MORAES, A. S. **Caracterização farmacêutica de nanocápsulas de timol e avaliação da permeação cutânea e da atividade repelente contra *Aedes aegypti***. 2015. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

MOREIRA, M. R. C.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; FREITAS, R. M. Mapeamento científico e patentário do mirtenol: um monoterpene com atividade psicofarmacológica. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 8, n. 3, p. 478-487, 2015.

MOREIRA, S. B. C.; GUIMARÃES-BRASIL, M. O.; HOLANDA-NETO, J. P.; SOUZA, M. C. M.; SOUZA, E. A. Avaliação *in vitro* da eficácia do óleo essencial do alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) no combate a varroase em *Apis mellifera* L. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2016.

NARENDERAN, S. T.; MEYYANATHAN, S. N.; KARRI, V.V. S. R. Experimental design in pesticide extraction methods: A review. **Food Chemistry**, Udhagamandalam, v. 289, p. 384-395, 2019.

NIST – NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **WebBook**. Gaithersburg, 2019. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

NUNES, R. S.; SENNA, B. A. A.; SILVA, J. A.; SANTANA, D. P. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. **Revista Brasileira de Farmácia**, Recife, v. 86, n. 3, p. 87-91, 2005.

NUNES, R. T.; SILVA, M. R. R.; ABRÃO, F. Y.; FERNANDES, O. F. L.; SÁ, F. A. S.; SOUZA, L. K. H. Effects of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. against *Cryptococcus neoformans*. **Revista Patologia Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 3, p. 273-284, 2016.

OLIVEIRA, J. R. **Avaliação de atividades biológicas dos extratos de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho)**. 2016. 158 f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal)-Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, SP, 2016.

OTONI, C. G.; MOURA, M. R.; AOUADA, M. F. A.; CAMILLOTO, G. P.; CRUZ, C. R. S.; LOREVICE, M. V.; SOARES, N. F. F.; MATTOSO, L. H. C. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, São Carlos, v. 41, p. 188-194, 2014.

OZOGUL, Y.; YUVKA, I.; UCAR, Y.; DURMUS, M.; KÖSKER, A. R.; ÖZ, M.; OZOGUL, F. Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. **LWT - Food Science and Technology**, Adana, v. 75, p. 677-684, 2016.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, Campinas, v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010.

PEREIRA, C. V. L. **Extratos bioativos de frutos amazônicos por química verde: extração por líquido pressurizado (PLE) e fluido supercrítico (SFE)**. 2015. 96 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 2015.

PEREIRA, G. G. **Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões**. 2008. 138 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

PEREIRA, T. A. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação.** 2011. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos.** 2006. 208 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.

PIRES, V. G. A.; MOURA, M. R. Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial. **Química Nova**, Ilha Solteira, v. 40, n. 1, p. 1-5, 2017.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; CIMPEANU, C.; TURCUS, V.; PREDOI, G.; IORDACHE, F. Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity - A critical view. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Bucareste, v. 157, p. 1326-1345, 2018.

POHLMANN, A. R.; FONSECA, F. N. PAESE, K.; DETONI, C. B.; CORADINI, K.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Poly(E-caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion Drug Delivery**, Porto Alegre, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

PONTES, A. C. F. **Análise de variância multivariada com a utilização de testes não-paramétricos e componentes principais baseados em matrizes de postos.** 2005. 117 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2005.

PONTES, S. F. O. **Desenvolvimento de nanoemulsões de óleos essenciais incorporadas em filme de metilcelulose para uso em alimentos.** 2013. 129 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

PRAKASH, A.; VADIVEL, V.; RUBINI, D.; NITHYANAND, P. Antibacterial and antibiofilm activities of linalool nanoemulsions against *Salmonella Typhimurium*. **Food Bioscience**, Tâmil Nadu, v. 28, p. 57-65, 2019.

QUATRIN, P. M.; VERDI, C. M.; SOUZA, M. E.; GODOI, S. N.; KLEIN, R.; GUNDEL, A.; WAGNER, R.; VAUCHER, R. A.; OURIQUE, A. F.; SANTOS, R. C. V. Antimicrobial and antibiofilm activities of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 230-242, 2017.

RAI, M.; PARALIKAR, P.; JOGEE, P.; AGARKAR, G.; INGLE, A. P.; DERITA, M.; ZACCHINO, S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, Maharashtra, v. 519, p. 67-78, 2017.

RAVIADARAN, R.; CHANDRAN, D.; SHIN, L. H.; MANICKAM, S. Optimization of palm oil in water nano-emulsion with curcumin using microfluidizer and response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, Selangor, v. 96, p. 58-65, 2018.

REYES-JURADO, F.; CERVANTES-RINCÓN, T.; BACH, H.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. **Industrial Crops & Products**, San Andrés Cholula, v. 131, p. 90-95, 2019.

ROCHA, B. C. A. **Extração e caracterização do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2013. 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

ROCHA, R. P. D.; MELO, E.C.; BARBOSA, L.C.A.; CORBÍN, J. B.; BERBET, P. A. Influência do processo de secagem sobre os principais componentes químicos do óleo essencial de tomilho. **Revista Ceres**, v. 59, n. 5, p. 731–737, 2012.

ROCKENBACH, A. P.; RIZZARDI, M. A.; NUNES, A. L.; BIANCHI, M. A.; CAVERZAN, A.; SCHNEIDER, T. Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Passo Fundo, v. 17, n. 1, p. 59-70, 2018

ROMERO, A. L.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R. C.; DINIZ, S. P. S. S. Atividade do Óleo Essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) Contra Fungos Fitopatogênicos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Maringá, v. 11, n. 4, p. 15-18, 2009.

ROMERO, A. L.; ROMERO, R. B.; SILVA, E. L.; DINIZ, S. P. S. S.; OLIVEIRA, R. R.; VIDA, J. B. Composição Química e Atividade do Óleo Essencial de *Origanum vulgare* Sobre Fungos Fitopatogênicos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Maringá, v. 14, n. 4, p. 231-235, 2012.

ROSANI, L. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de nanoemulsões do tipo óleo em água com óleos vegetais**. 2011. 85 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

RYU, V.; MCCLEMENTS, D. J.; CORRADINI, M. G.; MCLANDBOROUGH, L. Effect of ripening inhibitor type on formation, stability, and antimicrobial activity of thyme oil nanoemulsion. **Food Chemistry**, Amherst, v. 245, p. 104-111, 2018.

SABIN, J. G.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Santa Cruz do Sul, v. 40, n.3, p. 387-396, 2004.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of foodgrade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, Lérida, v. 43, p. 547-556, 2015.

SANTANA, H. C. D. **Caracterização química do óleo essencial de *Baccharis reticularia* DC. Em função de diferentes procedências e da sazonalidade no Distrito Federal**. 2013. 84 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade de Brasília, 2013.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; SOARES, M. J. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 783-790, 2007.

SANTURIO, D. F.; JESUS, F. P. K.; ZANETTE, R. A.; SCHLEMMER, K. B.; FRATON, A.; FRIES, L. L. M. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thyme and of Thymol against *Escherichia coli* Strains. **Acta Scientiae Veterinariae**, Santa Maria, v. 42, p. 1-4, 2014.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, Porto Alegre, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SILVA, C. M. A. **Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco – uma inovação no controle de fitopatógenos**. 2013. 112 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; FILHO, A. M. O. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v.27, n. 1, p. 46-49, 2004.

SIMONAZZI, A.; DAVIES, C.; CID, A. G.; GONZO, E.; PARADA, L.; BERMÚDEZ, J. M. Preparation and Characterization of Poloxamer 407 Solid Dispersions as an Alternative Strategy to Improve Benznidazole Bioperformance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Salta, v. 107, p. 2829-2836, 2018.

SOUSA, C. F. S.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SOUZA, P. R. T. **Terpenos isolados de *Trichilia casaretti* e *Trichilia silvatica* (Meliaceae)**. 2008. 136 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2008.

SOUZA, T. T. C. **Nanoemulsões aplicadas à recuperação avançada de petróleo**. 2013. 114 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado Engenharia e Tecnologia de Materiais)-Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Selangor, v. 2016, p. 1-21, 2016.

TAVEIRA, S. F. **Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele**. 2009. 48 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

TEIXEIRA, D. A. **Produção de biomassa e teor de cumarina em duas espécies de guaco (*Mikania glomerata sprengel* e *Mikania laevigata schultz Bip ex Baker*) em função da adubação orgânica**. 2017. 60 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Horticultura))-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

VELOSO, R. A.; CASTRO, H. G.; BARBOSA, L. C. A.; CARDOSO, D. P.; JÚNIOR, C. A. F.; SCHEIDT, G. N. Teor e composição do óleo essencial de quatro acessos e duas cultivares de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 364-371, 2014.

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. 2005. 215 f. Monografia (Especialização em Estatística)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

WAN, J.; ZHONG, S.; SCHWARZ, P.; CHEN, B.; RAO, J. Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. **Food Chemistry**, Fargo, v. 291, p. 199-206, 2019.

WILD, L. B. **Nanoemulsões para administração parenteral de fármacos**. 2010. 48 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Kronshagen, V. 56, p. 1257-1272, 2004.

XUE, J.; DAVIDSON, M.; ZHONG, Q. Antimicrobial activity of thyme oil co-nanoemulsified with sodium caseinate and lecithin. **International Journal of Food Microbiology**, Knoxville, v. 210, p. 1-8, 2015.

ZAMBONIN, C. G.; QUINTO, M.; VIETRO, N.; PALMISANO, F. Solid-phase microextraction – gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. **Analytical, Nutritional and Clinical Methods**, Bari, v. 86, p. 269-274, 2004.

ZIANI, K.; CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Amherst, v. 59, n.11, p. 6247-6255, 2011.

ZIMATH, P. L.; RIBEIRO, T. V.; DALMAGRO, A. P.; SANTOS, M. E.; GASPARETTO, A.; CRUZ, A. B.; MALHEIROS, A.; SOUZA, M. M. Avaliação psicofarmacológica do óleo essencial de *Piper amplum*. **Revista Fitos**, Itajaí, v. 11, n. 2, p. 119-249, 2017.

APÊNDICE A – CO-VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TIMOL A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A co-validação da metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência e posterior análise das amostras foi realizado de acordo com a validação de Otoni e colaboradores (2014) com modificações. Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com bomba modelo IC-20AT, detector SPD-M20A, sistema controlador CBM-20A e injetor SIL-20A HT. Como fase estacionária utilizou-se uma coluna Zorbax Eclipse Plus C-18 (250 mm x 4,6; 5 μ m) e pré-coluna Phenomenex[®] C-18 (4,0 x 3,0 mm, 5 μ m). A fase móvel foi composta por acetonitrila:água (55:45, v/v). O equipamento foi operado a temperatura ambiente, empregando fluxo isocrático de 1,0 mL/min. O comprimento de onda utilizado para detecção do timol foi de 276 nm e o tempo de retenção das análises foi de aproximadamente de 12,5 minutos.

1. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO E AMOSTRAS

1.1 Preparação da solução padrão

Para obtenção da solução padrão foram pesados, exatamente, 1,0102 g de timol (grau de pureza 98,5%), transferido para um balão volumétrico de 10 mL, solubilizado com acetonitrila, para obtenção de uma concentração de 1 mg/mL. A partir desta, 200 μ L foram diluídos a 10 mL de acetonitrila para obtenção da solução padrão de 20 μ g/mL.

1.2. Preparação das amostras

Para extração do timol das nanoemulsões (concentração de 4,8 mg/mL), uma alíquota de 41,7 μ L foi diluída em balão volumétrico de 10 mL com acetonitrila e 30 inversões manuais do balão volumétrico foram realizadas para obtenção de uma concentração de 20 μ g/mL. Para análise no CLAE, as amostras foram previamente filtradas em membrana de celulose (0,45 μ m).

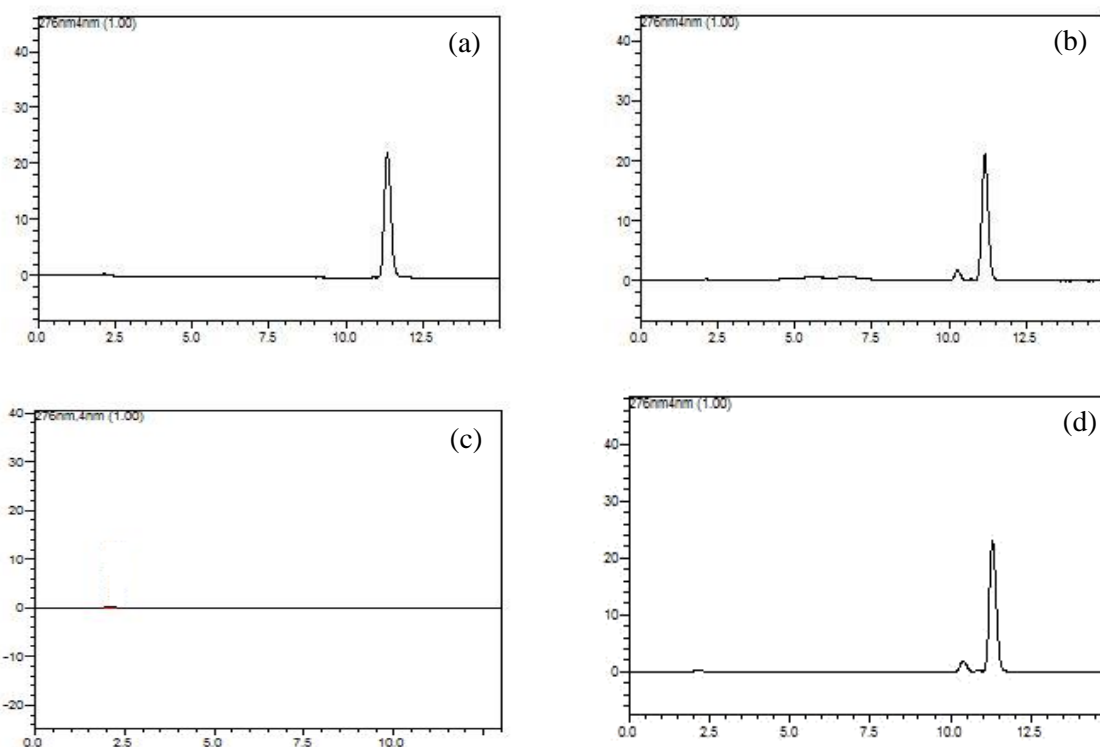
2. VALIDAÇÃO MÉTODO ANALÍTICO

Os parâmetros avaliados na validação do método analítico incluem especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária para o óleo de tomilho e para a nanoemulsão) e exatidão.

2.1 Especificidade

Para a determinação deste parâmetro foi utilizada a nanoemulsão sem a presença do óleo essencial de tomilho, contendo os demais excipientes. Deste modo, as amostras foram submetidas ao mesmo tratamento das amostras contendo o óleo (item 1.2), filtradas, injetadas no cromatógrafo e analisadas quanto a possível interferência dos excipientes. Com base na Figura 1, é possível verificar que o método mostrou-se específico para análise de timol, sem a presença de interferentes no pico cromatográfico.

Figura 1 – Cromatogramas obtidos por CLAE para a quantificação de timol na (a) solução padrão (20 µg/mL de timol), (b) na nanoemulsão NE-OT-CI (20 µg/mL de timol), (c) dos excipientes da nanoemulsão (ausência do óleo de tomilho) e (d) no óleo essencial de tomilho livre (20 µg/mL de timol)



2.2 Linearidade

A curva analítica foi construída nas concentrações de 5, 10, 20, 40 e 50 µg/mL. As soluções foram preparadas a partir da diluição do padrão em acetonitrila. Três curvas analíticas independentes foram construídas e a linearidade foi estimada a partir do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e avaliada por análise de variância (ANOVA).

Os resultados obtidos indicam adequado coeficiente de correlação ($r = 0,9998$; $y = 16358x + 9894,1$), regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} = 7160,7832 > F_{\text{tabelado}} = 4,96$) e sem desvio de linearidade ($F_{\text{calculado}} = 0,5597 < F_{\text{tabelado}} = 3,71$) demonstrando a linearidade do método na faixa de 5 a 50 µg/mL.

2.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir das seguintes equações:

$$LD = 3,3 \times DP / S$$

$$LQ = 10 \times DP / S$$

onde, DP = desvio padrão do intercepto com o eixo y e S = inclinação da curva analítica.

O LD calculado correspondeu a 1,09 µg/mL e o LQ a 3,63 µg/mL.

2.4 Precisão

A precisão do método foi obtida em nível de repetibilidade e precisão intermediária para o óleo de tomilho e para a nanoemulsão. A repetibilidade foi determinada a partir da análise de seis amostras distintas do óleo e da nanoemulsão, ambos a 20 µg/mL, preparadas pelo mesmo analista, no mesmo dia e sob as mesmas condições instrumentais. A precisão intermediária foi realizada a partir da análise do óleo de tomilho e da nanoemulsão na concentração de 20 µg/mL, em triplicata, por dois analistas diferentes em 3 dias consecutivos. Os resultados obtidos foram expressos em relação ao desvio padrão relativo (DPR).

Deste modo, os resultados obtidos neste parâmetro para o óleo essencial de tomilho e para a nanoemulsão encontram-se na Tabela 1 e 2. Os valores de DPR foram de 0,69% e

0,84% para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente, do óleo de tomilho e a repetibilidade e precisão intermediária da nanoemulsão apresentaram DPR de 1,2% e 1,00%, respectivamente, demonstrando que o método analítico é preciso tanto para o óleo quanto para a nanoemulsão dentro da faixa de concentração em estudo.

Tabela 1 – Resultados da precisão do método analítico por CLAE (repetibilidade e precisão intermediária) para quantificação do timol no óleo essencial de tomilho

	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	DPR (%)
<i>Intra-dia</i>				
Dia 1 (n=6)	20,0	19,58 \pm 0,28	97,91 \pm 0,67	0,69
<i>Inter-dia</i>				
Dia 1 (n=3)	20,0	19,49 \pm 0,14	97,47 \pm 0,14	0,77
Dia 2 (n=3)	20,0	19,45 \pm 0,04	97,29 \pm 1,04	1,07
Dia 3 (n=3)	20,0	19,35 \pm 0,10	96,79 \pm 0,64	0,67
Média (n=9)	20,0	19,43 \pm 0,09	97,18 \pm 0,61	0,84

Tabela 2 – Resultados da precisão do método analítico por CLAE (repetibilidade e precisão intermediária) para quantificação do timol na nanoemulsão

	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	DPR (%)
<i>Intra-dia</i>				
Dia 1 (n=6)	20,0	19,37 \pm 0,06	96,84 \pm 1,17	1,2
<i>Inter-dia</i>				
Dia 1 (n=3)	20,0	19,49 \pm 0,04	97,44 \pm 0,22	0,22
Dia 2 (n=3)	20,0	19,61 \pm 0,26	98,04 \pm 1,29	1,31
Dia 3 (n=3)	20,0	19,33 \pm 0,29	96,66 \pm 1,43	1,48
Média (n=9)	20,0	19,48 \pm 0,20	97,38 \pm 0,98	1,00

2.5 Exatidão

Este parâmetro foi avaliado para o óleo de tomilho, na qual foi realizado a partir do teste de recuperação. Para realização desta análise, três amostras do óleo de tomilho foram extraídas em acetonitrila para concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$ de timol. Após, foram

acrescentadas concentrações conhecidas da solução padrão de timol, obtendo concentrações de 16, 20 e 24 $\mu\text{g/mL}$ de timol, o que correspondeu a 80, 100 e 120% da concentração padrão de análise (20 $\mu\text{g/mL}$). O resultado obtido para exatidão encontra-se disposto na Tabela 3. A recuperação média obtida foi de $101,48 \pm 1,99 \%$, mostrando-se um método exato.

Tabela 3 – Resultados da exatidão do método analítico por CLAE (repetibilidade e precisão intermediária) para quantificação do timol no óleo essencial (n=3)

Amostra	Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
A1	6,00	$6,13 \pm 0,04$	$102,24 \pm 0,68$	0,67
A2	10,00	$10,30 \pm 0,06$	$102,98 \pm 0,60$	0,58
A3	14,00	$13,89 \pm 0,09$	$99,22 \pm 0,63$	0,63
			Recuperação média (%)	$101,48 \pm 1,99$
			DPR	1,96

A1, A2 e A3: amostras acrescidas da solução padrão